

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1931.1932

N° 11

Contribution à l'Étude
du Dosage Colorimétrique de la Tyrosine
et du Tryptophane dans les matières protéiques

THÈSE

pour l'obtention du Diplôme Supérieur de Pharmacien de 1^{re} Classe

présentée et soutenue le *Février 1932*

PAR

Jean GUÉRIN

Pharmacien

Ancien Interne des Hôpitaux de Paris

JURY

MM. HÉRISSEY, *Président.*
FABRE, *Professeur*
FLEURY, *Agrégé.*

AMIENS
IMPRIMERIE NOUVELLE
28-30, Rue des Vergeaux

— 1932 —



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547506_0043

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1931.1932

N° 11

Contribution à l'Étude
du Dosage Colorimétrique de la Tyrosine
et du Tryptophane dans les matières protéiques

THÈSE

pour l'obtention du Diplôme Supérieur de Pharmacien de 1^{re} Classe

présentée et soutenue le *Février 1932*

PAR

Jean GUÉRIN

Pharmacien

Ancien Interne des Hôpitaux de Paris

JURY { MM. HÉRISSEY, *Président.*
FABRE, *Professeur*
FLEURY, *Agrégé.*

AMIENS
IMPRIMERIE NOUVELLE
28-30, Rue des Vergeaux

— 1932 —

PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. P. GUÉRIN,	Doyen, *, ☼ I.
P. LEBEAU,	Assesseur, O. *, ☼ I.
G. DURSENT,	Secrétaire, *, ☼ I.

PROFESSEURS

MM. GUÉRIN, *, ☼ I.	Botanique générale.
BÉHAL, Membre de l'Institut,	
G. O. *, ☼ I.	Chimie organique.
PERROT, O. *, ☼ I.	Histoire naturelle des Médicaments.
COUTIERE, O. *, ☼ I.	Zoologie.
LEBEAU, O. *, ☼ I.	Pharmacie chimique.
BOUGAULT, *, ☼ I.	Chimie analytique.
GORIS, *, ☼ I.	Pharmacie galénique.
TASSILLY, *, ☼ I.	Physique.
DAMIENS, *, ☼ I.	Chimie minérale.
HÉRISSEY, O. *, ☼ I.	Chimie biologique.
SOMMELET, *, ☼ I.	Hydrologie et Hygiène.
LUTZ, *, ☼ I.	Cryptogamie et Microbiologie.
FABRE, ☼ I.	Toxicologie.
LAUNOY, O. *, ☼ I.	Professeur sans chaire.

Doyen Honoraire : M. RADAIS, O. *, ☼ I.

Professeurs Honoraires : MM. A. VILLIERS, *, ☼ I.
DÉLÉPINE, O. *, ☼ I.
GUERBET, O. *, ☼ I.

CHARGÉS DE COURS

MM. Marc HONORAT, *, ☼ I.	Législation et Déontologie pharmaceutiques.
LAUNOY, O. *, ☼ I.	Pharmacodynamie.
DELABY, *, ☼ I.	Minéralogie.
BACH, ☼ I.	Microbiologie.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. DELABY, *, ☼ I.	MM. MASCRÉ, ☼ I.	MM. BEDEL, ☼ I.
PICON, ☼ I.	FLEURY, ☼ I.	REGNIER, ☼ I.
	BACH, ☼ I.	

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. BEDEL, ☼ I., agrégé chargé des T. P. de 1 ^{re} année	Chimie générale.
FLEURY, ☼ I., et RÉGNIER, ☼ I., agrégés, chargés des travaux de	Chimie analytique.
SOUÈGES, ☼ I.	Micrographie.
LEROUX, ☼ I.	Physique.
DEVAL, ☼ I.	Microbiologie.
DELABY, *, ☼ I., PICON, ☼ I., et MASCRÉ, ☼ I., agrégés chargés des	Travaux généraux de 4 ^e année.

Bibliothécaire en Chef : M. BERNARD, ☼ I.



A LA MÉMOIRE

DE MONSIEUR LE PROFESSEUR GRIMBERT

A MON ONCLE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR GUÉRIN

DOYEN DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

*Témoignage de reconnaissance et d'affection
sincère.*

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR HÉRISSEY

PROFESSEUR DE CHIMIE BIOLOGIQUE

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

OFFICIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

Hommage de profond respect.

A MA FEMME

INTRODUCTION

Parmi les méthodes de dosage de la tyrosine et du tryptophane dans les matières protéiques publiées jusqu'à ce jour, les méthodes colorimétriques sont celles qui ont suscité les recherches les plus nombreuses et les plus approfondies.

Les méthodes colorimétriques sont en principe très simples ; à première vue, leur application ne soulève pas de difficultés très grandes. A la réflexion, elles apparaissent, par contre, soumises à de nombreuses incertitudes.

Tout d'abord la spécificité du réactif utilisé n'est jamais telle qu'on soit sûr de ne doser que le corps ou la fonction que l'on désire déterminer. On est ainsi amené assez souvent à pratiquer, avant le dosage, une séparation destinée à rendre la coloration observée plus spécifique.

De là une première difficulté, qui, d'ailleurs, ne peut jamais être résolue qu'incomplètement. On connaît en effet trop imparfaitement encore l'exacte composition des matières albuminoïdes ; même lorsqu'on croira ne laisser entrer en réaction qu'un composant déterminé, un doute subsistera toujours et l'on pourra se demander s'il ne reste pas quelque acide aminé inconnu non séparé et donnant la même réaction. De plus, par le fait même que l'on est amené à séparer le corps à doser, il devient nécessaire d'opérer une hydrolyse afin de simplifier à l'extrême la

molécule albuminoïde. Que cette hydrolyse soit chimique (alcalis, acides) ou fermentaire, au bout de combien de temps sera-t-elle complète ? Ne risque-t-on pas bien souvent de ne soumettre à la réaction que des corps imparfaitement dissociés ou des molécules insuffisamment simplifiées ?

De plus, cette hydrolyse est-elle sans dommage pour le corps à doser, le respecte-t-elle, ou bien ne crée-t-elle pas des produits d'altération susceptibles d'interférer avec la réaction colorée cherchée ? C'est ce que l'on peut craindre avec une hydrolyse alcaline ou acide forcément brutales. On peut même se demander si l'hydrolyse par ferment n'apporte pas à la réaction un facteur de réversibilité, ce qui contribuerait évidemment encore à compliquer le problème. Les ferments utilisés, de nature protéique, apportent aussi une autre cause d'erreur ; d'abord ils sont plus ou moins purs et ensuite participent eux aussi à la réaction colorée. Ici encore difficulté nouvelle puisque l'on devra au préalable opérer un titrage de chaque ferment comme pour une matière protéique ordinaire.

En supposant au contraire que le réactif employé soit très spécifique d'un composant des protéines, qu'une séparation de ce composant ne s'impose pas et par conséquent une hydrolyse non plus, on peut toujours se demander avec juste raison si la réaction que l'on obtient est bien intégrale et si elle équivaut bien à ce que donnerait ce composant s'il agissait seul et débarrassé du reste de la molécule.

On voit donc qu'un dosage colorométrique sur des matières protéiques n'apparaît pas comme une chose très

aisée à réaliser et que même lorsque toute difficulté semblera surmontée, lorsque la réaction paraîtra s'effectuer normalement, il sera très difficile d'attribuer aux résultats une valeur absolue.

Aussi, plutôt que d'élaborer de nouvelles méthodes colorométriques, il nous a semblé intéressant de soumettre à des comparaisons celles qui ont déjà été décrites. Toutefois, même en limitant nos investigations à la tyrosine et au tryptophane, nous nous sommes trouvés devant un nombre trop grand de méthodes pour pouvoir toutes les énoncer et nous avons dû limiter notre choix.

Parmi les méthodes proposées, les unes s'adressent à des réactions considérées comme spécifiques de l'un des deux acides aminés, les autres utilisent des réactions communes à ces deux corps qui ont été au préalable séparés par une technique appropriée.

Comme réaction spécifique de la tyrosine, ou plus exactement de la fonction phénol, on a proposé la réaction indiquée en 1849 par MILLON pour les matières protéiques. Nous retiendrons pour étude quelques procédés basés sur cette réaction.

En ce qui concerne le tryptophane, de très nombreuses méthodes ont été proposées qui utilisent la réaction très marquée donnée par ce corps avec diverses aldéhydes (benzaldéhyde, acide glyoxylique, paradiméthylamino-benzaldéhyde, vanilline) en milieu fortement acide (acide chlorhydrique, sulfurique, phosphorique). Malgré la sensibilité de ce genre de méthode, nous n'avons pas cru devoir engager nos recherches dans cette voie ; car il semble bien qu'il soit très difficile d'éliminer les couleurs parasites

ainsi que d'obtenir des teintes comparables, comme vient de le montrer MÖRNER [23] récemment.

Enfin, la tyrosine et le tryptophane présentent deux réactions colorées communes qui peuvent aussi être considérées comme étant vraisemblablement spécifiques de la fonction phénol : la réaction dite xanthoprotéique et la réaction dite de Folin avec le réactif phosphotungstique. Ces méthodes nous ont paru intéressantes à examiner.

Avant de les passer en revue qu'il nous soit permis de rendre hommage à la mémoire de M. le Professeur GRIMBERT, professeur de chimie biologique à la Faculté de Pharmacie, qui nous avait paternellement accueilli au nombre de ses élèves, et de remercier sincèrement M. le Professeur HÉRISSEY d'avoir bien voulu accepter la présidence de cette thèse.

Nous nous en voudrions également de ne pas dire ici toute la reconnaissance que nous avons envers M. le Professeur agrégé FLEURY pour les conseils qu'il n'a cessé de nous prodiguer au cours de nos travaux. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre gratitude.

Nous n'aurons garde non plus d'oublier l'hospitalité qui nous fut si largement accordée dans leurs laboratoires par M. le Professeur GUÉRIN, notre oncle, et par M. Henry GUÉRIN, Assistant. Nous tenons à les remercier une fois de plus pour leur obligeance qui nous a facilité l'élaboration de cette thèse.

RÉSUMÉ HISTORIQUE

des principales réactions colorées de la Tyrosine et du Tryptophane dans leur application au dosage de ces deux acides aminés

Au cours de ce travail nous avons utilisé les trois réactions suivantes :

la réaction de MILLON pour la tyrosine,

la réaction xanthoprotéique pour la tyrosine et le tryptophane,

la réaction phospho-tungsto-molybdique des phénols « dite de FOLIN » pour la tyrosine et le tryptophane.

Nous allons passer ces méthodes en revue en remontant à leur origine et en examinant les modifications successives et les perfectionnements que leur ont fait subir les divers auteurs qui, tour à tour, les ont étudiées.

a) LA RÉACTION DE MILLON

1. - Son origine. - Ses modifications. - Son mécanisme

En 1849, Millon [22] a indiqué un réactif des substances protéiques obtenu en dissolvant, dans certaines conditions, du mercure dans de l'acide nitrique.

En 1853, Hoffmann et Stadeler [13] ont constaté que la tyrosine donne par chauffage avec ce réactif une coloration rouge ; mais c'est Lothar Meyer [21] qui, en 1884, a indiqué que la réaction ne se produit qu'en présence d'acide nitreux, la tyrosine ne donnant avec l'acide nitrique et le nitrate mercurique purs qu'un précipité blanc jaunâtre, même à chaud.

En 1865, Kühne et Rudneff [17] avaient déjà montré en effet que Millon avait indiqué à tort le nitrate mercurieux comme indispensable à la réaction à laquelle il a donné son nom. Cette dernière à leur avis n'était possible que parce que son réactif renfermait à la fois du nitrate mercurique et de l'acide nitreux.

En 1872, Plugge [27] a montré l'application de cette réaction au phénol ordinaire, au thymol et à l'acide salicylique.

Enfin en 1900 et 1901 Vaubel [31], puis Nasse [25], ont établi que la réaction de Millon des substances protéiques correspond bien aux groupes phénoliques de leurs molécules.

Le mécanisme même de la réaction, établi par Gibbs [10], et contrôlé par Folin et Cioccalteu [5], consiste en la formation d'un nitrosophénol, avec formation successive de produits colorés, l'ensemble de la réaction étant catalysé par les sels de mercure. Nous appliquerons en effet, comme nous le verrons plus tard, un procédé type Millon, dans lequel il n'entre pas d'acide nitrique, mais de l'acide nitreux accompagné de sulfate mercurique.

2. - Utilisation de la réaction de Millon comme dosage

Méthode de Thomas :

En 1921, Thomas [29] résolut d'utiliser cette réaction au dosage des corps à fonction phénol des matières protéiques. Contrairement à ce qui était alors admis, Thomas a constaté que même après hydrolyse le tryptophane et l'oxytryptophane donnaient une coloration rose. Pour éliminer le tryptophane, il le précipitait avec du sulfate mercurique, l'oxytryptophane restant en solution. Ne pouvant espérer doser de la tyrosine pure, Thomas dû se contenter de calculer en tyrosine un chiffre représentant l'ensemble des produits d'hydrolyse de nature phénolique correspondant à la substance protéique étudiée. Il a désigné ce chiffre sous le nom d'indice de Millon ou indice phénolique.

Dans le procédé indiqué par Thomas, on hydrolyse la matière protéique par ébullition pendant 12 heures avec de l'acide sulfurique dilué qu'on précipite par la suite avec de la baryte. On précipite le tryptophane en milieu nitrique au moyen d'une solution de nitrate mercurique pur. On décolore par le noir animal et on effectue la réaction de Millon. Après deux heures de repos, on compare avec une solution type de tyrosine soumise au même traitement.

Dans ces conditions Thomas admet qu'il n'y a entraînement de la tyrosine ni par la baryte, ni par le nitrate mercurique, ni par le noir animal. Il a pu vérifier qu'il n'y a pas formation pendant l'hydrolyse de produits phénoliques entraînables par la vapeur d'eau.

Méthode de Zuwerkalow [33] :

Cette méthode est beaucoup plus simple que la précédente, car elle ne nécessite pas d'hydrolyse. Elle consiste à faire une dissolution aqueuse ou sodique de la matière protéique, de lui faire subir l'action du sulfate mercurique et du nitrite de soude en présence d'acide acétique, en chauffant le liquide jusqu'à début d'ébullition.

La coloration obtenue est comparée à celle obtenue dans les mêmes conditions avec une solution étalon de tyrosine.

Dans ces conditions Zuwerkalow prétend obtenir les mêmes résultats qu'en opérant une hydrolyse préalable. Il a constaté de plus que le tryptophane ne gêne pas la réaction.

Nous avons étudié cette méthode dans le chapitre I de notre travail.

Procédé de Folin et Ciocalteu [5] :

La réaction de Millon a été utilisée par ces auteurs au cours de dosages séparés de la tyrosine et du tryptophane dans les matières protéiques. Folin et Ciocalteu au cours d'un essai de séparation du tryptophane au moyen du sulfate mercurique ont constaté qu'une coloration rouge s'établissait directement à froid sur le liquide de filtration, si on l'additionnait de nitrite de soude. Cette réaction qui avait lieu à froid était due au contact prolongé de la liqueur avec le sulfate mercurique. Or, dans la technique de la réaction de Millon jusqu'ici utilisée,

le fait de chauffer rendait la coloration instable et les résultats variables.

Les auteurs ont donc établi une nouvelle méthode de dosage séparé de la tyrosine et du tryptophane, en tenant compte de la possibilité de faire la réaction de Millon à froid, la tyrosine étant dosée par la réaction de Millon et le tryptophane au moyen d'un autre réactif dont nous parlerons dans la suite. Cependant si l'on veut pouvoir utiliser cette réaction pour une détermination quantitative de la tyrosine, il est indispensable que la solution standard dont on se servira, ainsi que les liquides de filtration, aient la même composition en acide et la même teneur en sulfate mercurique, et d'autre part il faut éliminer tout tryptophane, la moindre trace de ce corps étant susceptible de provoquer un louche gênant.

Principe de la méthode :

On précipite le tryptophane, dans les hydrolysats, à l'aide d'une solution de sulfate mercurique. On centrifuge; la liqueur surnageante chauffée, après avoir été adaptée à un titre d'acidité déterminé, est additionnée à froid de nitrite de soude. Il se développe une coloration rouge que l'on compare à celle d'une solution de tyrosine traitée d'une façon identique.

Procédé de Folin et Marenzi [8] :

Cette méthode est calquée sur la précédente. Elle ne diffère de cette dernière que par le mode d'hydrolyse qui s'effectue au bain-marie et non à feu nu. D'autre part le temps de chauffage nécessaire à la réaction de Millon est réduit de 15 à 5 minutes.

Ensuite, les auteurs conseillent dans le cas d'une hydrolyse acide l'emploi de l'acide sulfurique et non par exemple d'acide chlorhydrique qui empêcherait la réaction de Millon.

Nous avons étudié cette méthode ; nous en exposerons la technique détaillée dans le chapitre correspondant.

Procédé de Mac Farlane et Fulmer [20] :

Ce procédé qui comporte un dosage de tyrosine au moyen de la réaction de Millon ne diffère des deux méthodes dernièrement exposées que par une hydrolyse préalable au moyen d'enzymes. Nous reviendrons plus loin sur cette méthode que nous avons étudiée dans notre travail.

b) LA RÉACTION XANTHOPROTÉIQUE

Son origine. - Ses modifications. - Variations en fonction du pH

La coloration jaune observée, lorsqu'on traite des matières protéiques par l'acide nitrique, est connue depuis fort longtemps sous le nom de réaction xanthoprotéique. Lorsque ces matières protéiques furent reconnues comme constituées par un édifice d'amino-acides, on établit rapidement que la tyrosine, l'un des premiers amino-acides connus, intervenait dans cette réaction xanthoprotéique, car elle se conduisait comme les matières protéiques vis-à-vis de l'acide nitrique.

La connaissance du rôle du tryptophane est d'acquisition toute récente.

C'est Fürth [9], en 1899, qui le premier avait soupçonné cette relation, en montrant que dans les produits d'hydrolyses des xanthoprotéines et des xanthomélanines on pouvait reconnaître des produits complexes, générateurs d'indol.

Mais c'est Lieben [19], qui, en 1924, établit d'une façon définitive la participation du tryptophane à la formation de dérivés nitrés des matières protéiques. D'ailleurs, dix-sept ans auparavant, E. Abderhalden et M. Kempe [1] en 1907, dans leur étude sur le tryptophane et quelques uns de ses dérivés, avaient observé, sans plus de détail, que « le tryptophane en solution aqueuse diluée donne une coloration jaune nette par chauffage avec l'acide nitrique ».

En 1919, C. Th. Mörner [23] avait étudié attentivement cette réaction colorée du tryptophane, ainsi que celle fournie par le mélange de tyrosine et de tryptophane en examinant la variation d'intensité de la teinte, lorsqu'on passe du milieu acide au milieu alcalin. L'auteur avait constaté qu'en milieu alcalin, la coloration du tryptophane est environ 3 fois plus forte qu'en milieu acide, tandis que pour la tyrosine le même changement de réaction fait passer l'intensité de la teinte de 1 à 45. Mörner émit alors l'idée qu'il doit être possible de doser colorimétriquement un mélange de ces deux corps en se basant sur cette observation.

Méthode de Tillmann, Hirsch et Stoppel [30] :

Tillmann, Hirsch et Stoppel, en 1928, ont mis au point une méthode basée sur l'observation de Mörner. Après avoir fixé, par une étude préalable, les quantités de tyrosine et de tryptophane qui correspondent (*après nitration et après avoir été amenées successivement à deux pH convenablement choisis*) à une quantité fixe de colorant convenablement choisi (méτανitrophénol), ils déterminent à ces deux pH, sur un mélange nitré de titre inconnu la quantité de colorant correspondant à la teinte du mélange. Ils ont ainsi tous les éléments nécessaires pour déterminer la composition du mélange en tyrosine et en tryptophane.

Nous avons soumis, dans le chapitre III, à une étude attentive cette méthode qui nous était apparue comme séduisante. On en trouvera l'exposé et la discussion à cet endroit de notre travail.

c) RÉACTION DE FOLIN

Cette réaction est basée sur la coloration bleue qui se développe lorsqu'on met en présence un corps à fonction phénol avec une solution déterminée phosphomolybdotungstique.

Comme nous le verrons au cours de cet exposé, cette réaction, contrairement à ce que pensait primitivement Folin, ne se produit pas seulement avec la tyrosine. Nous verrons au cours de cette étude que le tryptophane donne une coloration identique.

Origine de cette réaction. - Variétés de réactifs

C'est O. Folin et Denis [6] qui, en 1912, ont signalé une réaction colorée des matières protéiques avec un réactif à base de tungstate et de molybdate de soude, en présence d'acide phosphorique. Ils ont constaté que la coloration bleue qui s'établit est très stable et qu'elle est proportionnelle en intensité à la quantité de tyrosine contenue dans la protéine.

En 1927, Folin et Ciocalteu [5] ont donné de ce réactif des phénols une nouvelle formule que nous avons décrite à la page 48.

Méthode de Folin et Denis [6] :

La méthode de Folin et Denis consiste essentiellement à hydrolyser la matière protéique par l'acide chlorhydrique et à ajouter à l'hydrolysat une certaine quantité d'une solution de carbonate de soude ainsi que du réactif phosphomolybdotungstique. On compare au bout de dix minutes.

Les auteurs, en 1912, estimaient que la tyrosine est le seul amino-acide des matières protéiques susceptibles de réagir avec leur réactif. Ils pensaient aussi avec Osborne que jusqu'alors les méthodes employées ne permettaient pas de séparer sans perte la tyrosine des matières protéiques, c'est pourquoi les chiffres établis auparavant étaient plus faibles. Ils ont constaté, en outre, que la tyrosine réagissait aussi bien à l'état de combinaison qu'à l'état libre ; c'est pourquoi selon eux le temps d'hydrolyse importait peu.

Critique de cette méthode par Thomas [29] :

En 1921 Thomas a repris cette méthode de Folin et Denis. Il a constaté que les chiffres obtenus sont beaucoup plus élevés que ceux qui ont été donnés auparavant et en particulier que ceux fournis par la méthode gravimétrique. Thomas ajoute que bien que l'on ait admis (Abderhalden [1]) que la tyrosine pouvait contracter une combinaison soluble avec des acides diaminés comme la lysine, on ne peut admettre que cette combinaison ait été la cause d'erreur de tous les dosages précédents. Aussi Thomas n'admet que sous la plus grande réserve les résultats trouvés par Folin et Denis. Il s'est alors proposé de soumettre leur méthode à un contrôle serré.

Il a d'abord constaté que le temps optimum nécessaire à l'établissement complet de la coloration n'était pas de 10 minutes, mais de 30 minutes. D'autre part cette coloration ne lui semble pas due uniquement à la tyrosine.

En effet le tryptophane et l'oxytryptophane ont, entre les mains de Thomas, donné lieu à une coloration bleue intense même après une ébullition avec de l'acide chlorhydrique pendant 12 heures.

D'autre part beaucoup de corps semblent aussi réagir grâce à leurs propriétés réductrices, tels les sels ferreux, le chlorure stanneux, l'hyposulfite de soude, le sulfure d'ammonium, l'acide urique, l'aldéhyde benzoïque, la naphtylamine, etc..., corps dont l'action a été nettement établie.

En dépit des affirmations de Folin et Denis, Thomas

a pu prouver aussi que l'indol et ses dérivés réagissent sur le réactif phosphomolybdotungstique.

Thomas s'est demandé de plus si, au cours de l'hydrolyse chlorhydrique, proposée par Folin et Denis, il ne se forme pas de produits réducteurs ou de dérivés indoliques du tryptophane, et à son avis, l'on ne saurait non plus affirmer d'une façon catégorique qu'il n'existe dans les matières protéiques aucun acide aminé, inconnu jusqu'à présent, susceptible d'influer sur leur réactif.

Méthode de Folin et Looney [7] :

En 1922, Folin et Looney sont arrivés à reconnaître le bien-fondé de ces critiques. Ils établirent que seuls la tyrosine et le tryptophane donnent la réaction des phénols et que les amino-acides suivants ne la donnent pas : arginine, lysine, acide aspartique, histidine, acide glutamique, leucine, valine, asparagine et cystine.

Dans une nouvelle technique ils proposèrent alors de séparer, après hydrolyse, le tryptophane de la tyrosine par le sulfate mercurique. Dans la liqueur séparée du tryptophane on dose la tyrosine par le réactif des phénols en présence de carbonate de soude et de cyanure de sodium. Le précipité mercure-tryptophane est alors dissout au moyen de cyanure de sodium et le tryptophane à son tour est dosé par le réactif des phénols en présence de carbonate de soude.

Les auteurs d'autre part abandonnent l'hydrolyse acide et opèrent une hydrolyse par de la baryte. Les résultats, que Folin et Looney ont ainsi obtenus, n'ont été

entâchés que d'erreurs en plus ou en moins ne dépassant pas 4 %.

Méthode de Folin et Ciocalteu [5] :

En 1927, Folin, en collaboration avec Ciocalteu, a de nouveau modifié sa méthode. Il revint à l'hydrolyse alcaline en employant la soude. Il estima en outre que la séparation du tryptophane par le sulfate mercurique était incomplète et mit sur pied un nouveau mode de séparation, basé sur le même principe, mais dans lequel la tyrosine restait intégralement en solution.

Folin et Ciocalteu remplacèrent d'autre part le dosage de la tyrosine au réactif phosphomolybdotungstique par un dosage selon la méthode de Millon effectué à froid, en profitant de ce que la tyrosine est dissoute en milieu mercurique.

Enfin pour la dissolution du précipité mercure-tryptophane les auteurs proposèrent d'employer soit l'acide chlorhydrique puis l'hydrogène sulfuré pour séparer le mercure, soit le cyanure de sodium.

Méthode de Folin et Marenzi [8] :

En 1929, Folin et Marenzi ont cherché à appliquer à de très petites doses de matières protéiques les méthodes colorimétriques jusqu'alors établies. Le principe de leur méthode est le même que celui de Folin et Ciocalteu. Les seules modifications qu'ils y apportent sont d'abord le chauffage au bain-marie pour l'hydrolyse, puis la réduc-

tion à 5 minutes du temps de chauffage nécessaire à la réaction de Millon. Enfin dans le cas d'une hydrolyse acide, ils préconisent l'emploi de l'acide sulfurique et non de l'acide chlorhydrique qui empêcherait la réaction de Millon.

Méthode de Greenberg [11] :

En 1927, Greenberg a publié un procédé basé sur la réaction phosphomolybdotungstique dans lequel aucune hydrolyse n'est employée. L'auteur estime en effet que les matières protéiques donnent avec le réactif de Folin et Ciocalteu une coloration bleue dont l'intensité ne s'accroît pas après hydrolyse.

Nous avons étudié ce procédé en détail ; nous verrons qu'en l'appliquant dans certaines conditions bien déterminées, il permet d'obtenir des résultats constants.

Méthode de Mac Farlane et Fulmer [20] :

En 1930, Mac Farlane et Fulmer ont publié un procédé semblable à celui de Folin et Marenzeller, dans lequel les hydrolyses se font par enzymes.

Les auteurs ayant eu à déterminer les quantités de tyrosine et de tryptophane contenues dans un certain nombre de farines végétales et animales ont été amenés à utiliser différentes méthodes.

Parmi celles-ci, seules les méthodes colorimétriques sont celles qu'ils ont retenues, comme étant les plus précises et les plus pratiques. Toutefois les méthodes de

dosage du tryptophane par réaction sur les aldehydes leur ont donné des couleurs trop variables pour qu'elles se prêtent à un dosage exact.

Les auteurs, opérant sur des farines et non sur des matières protéiques pures, se heurtent à de nombreuses difficultés et établissent que dans la technique de Folin et Marenzi l'hydrolyse acide ou alcaline provoque la formation de produits agissant sur le réactif, une partie de ces substances pouvant être éliminées par le toluène. C'est pourquoi ils ont recours à l'hydrolyse diastasique. On trouvera plus loin la description de cette technique.

Méthodes de Séparation de la Tyrosine et du Tryptophane

Dans tous les procédés publiés sur le dosage colorimétrique de la tyrosine et du tryptophane et basés sur l'une des trois réactions suivantes : réaction de Millon, réaction xanthoprotéique et réaction phosphomolybdotungstique, seuls le nitrate mercurique et le sulfate mercurique ont été employés pour la séparation de ces deux acides aminés : le tryptophane en effet peut être précipité dans les hydrolysats par l'un ou l'autre de ces sels mercuriques qui l'entraîne sous forme d'un complexe mercure-tryptophane.

Thomas [29] est le seul à avoir employé le nitrate mercurique, et n'élimine pas le mercure puisqu'il se contente d'opérer une réaction de Millon.

En dehors de cette exception, la principale différence que l'on constate entre les divers procédés publiés réside soit dans le mode d'élimination postérieure du mercure,

soit dans le mode de dissolution du complexe mercure-tryptophane : nous allons passer en revue les diverses techniques préconisées.

Procédé de Folin et Looney [7] :

Le précipité obtenu après addition de sulfate mercurique est dissout dans un excès de cyanure de sodium ; mais dans ces conditions l'intensité de coloration fournie par le tryptophane est plus élevée, il convient donc de soumettre la solution étalon de tyrosine au même traitement par le cyanure de sodium.

Procédés de Folin et Ciocalteu [5] :

1. — Le tryptophane est précipité par le sulfate mercurique. On dissout le précipité dans 10^{cc} d'acide chlorhydrique normal, on chauffe au bain-marie bouillant pendant 10 minutes et on fait passer un courant d'hydrogène sulfuré jusqu'à obtention d'un précipité noir de sulfure de mercure ; on laisse reposer une heure et on centrifuge.

2. — Le tryptophane est précipité par le sulfate mercurique. On dissout le précipité dans 10^{cc} d'acide chlorhydrique normal. On porte au bain-marie bouillant pendant 30 minutes. On refroidit ensuite et l'on effectue la réaction phosphomolybdotungstique sans éliminer davantage le mercure.

Méthode de Folin et Marenzi [8] :

Méthode de Mac Farlane et Fulmer [20] :

Ces auteurs utilisent la précipitation du tryptophane par le sulfate mercurique. La dissolution du précipité est obtenue à l'aide de l'acide chlorhydrique normal, selon la deuxième méthode préconisée par Folin et Ciocalteu.

Dans les recherches que nous avons exposées dans les chapitres suivants, nous avons soumis à la comparaison les techniques de Folin et de Marenzi, celle de Mac Farlane et Fulmer et enfin celle de Greenberg. Nous verrons d'autre part quel parti on peut tirer des méthodes de Zuwerkalow et xanthoprotéique.

Plan de notre travail

CHAPITRE I

Étude de la méthode de Zuwerkalow.

CHAPITRE II

Étude de la méthode de Greenberg.

CHAPITRE III

Étude de la méthode de Tillmann, Hirsh et Stoppel.

CHAPITRE IV

Étude de la méthode de Folin et Marenzi.

CHAPITRE V

Comparaison des diverses méthodes étudiées dans les chapitres précédents.

RÉSUMÉ ET CONCLUSION

CHAPITRE I

ÉTUDE SUR LA DÉTERMINATION DE L'INDICE DE MILLON SELON LA TECHNIQUE DE ZUWERKALOW

La méthode que nous avons suivie est celle qui a été indiquée par Zuwerkalow. Elle présente, en effet, l'avantage de ne pas nécessiter d'hydrolyse ; il s'en suit que les manipulations en sont relativement simples.

Technique de la méthode :

On opère de la façon suivante :

Mélanger dans l'ordre :

Solution de l'albuminoïde à 10 %.....	1 cc
Acide acétique cristallisable	3 cc
SO ⁴ Hg (solut. à 10 % en poids dans SO ⁴ H ² à 5 %)	2 cc
Nitrite de soude à 5 %.....	1 gtte

Chauffer à feu nu jusqu'à début d'ébullition. Laisser refroidir et observer au colorimètre au bout de 15 à 20 minutes sous 10 $\frac{m}{m}$. La dissolution doit s'opérer facilement.

Employer comme solution étalon : 1 cc de tyrosine à 0 gr. 4 %.

Remarque :

La solution de l'albuminoïde peut être obtenue, si la chose est nécessaire, par dissolution dans de la soude à 5 %. D'autre part, la solution de sulfate mercurique est faite selon les proportions du réactif d'Hopkins :

Sulfate mercurique	10 grs
Solution d'acide sulfurique à 5 %	90 grs

Zuwerkalow [33] est d'avis qu'avec ce procédé il n'est pas nécessaire d'opérer l'hydrolyse et que dans ces conditions le tryptophane ne gêne pas. Enfin il utilise l'acide acétique pour éviter la formation d'un précipité.

Dans cette méthode il y a donc deux faits bien caractéristiques :

1° L'emploi de l'acide acétique.

2° L'emploi de sulfate mercurique en présence d'acide nitreux pour effectuer la réaction de Millon ; alors que la formule initiale de cette réaction comportait une dissolution de mercure métallique dans de l'acide azotique ce qui donnait finalement un mélange d'azotate mercurique, d'azotate mercureux et d'acide nitreux.

Examen critique de la méthode :

1° *Mode de chauffage :*

Zuwerkalow préconise le chauffage du mélange à feu

nu et jusqu'à début d'ébullition. Il nous a semblé que, sur ce point, les indications données par l'auteur étaient assez vagues et qu'il serait bon de préciser, quelque peu, le mode opératoire.

En premier lieu nous avons opéré le mélange dans des tubes à essais de 12 $\frac{\text{cm}}{\text{m}}$ de hauteur sur 12 $\frac{\text{mm}}{\text{m}}$ de diamètre. Nous avons pensé que l'on pourrait porter le tube à essai du mélange ainsi que celui de la solution étalon dans un bain-marie bouillant. Nous avons maintenu les tubes plongés dans l'eau bouillante de façon à ce que le mélange soit complètement immergé. Nous avons ainsi établi que le temps de chauffage optimum était de 1 minute, temps limite au delà duquel il se forme un précipité tandis que la coloration s'atténue.

2° *Stabilité de la coloration obtenue :*

Nous avons employé le colorimètre de Duboscq pour comparer les intensités de colorations fournies par la solution étudiée et par la solution étalon. Dans les expériences qui vont suivre nous avons observé cette dernière solution sous 10 $\frac{\text{mm}}{\text{m}}$. Nous avons pensé qu'il serait intéressant de mesurer le temps pendant lequel une réaction de Millon effectuée comme ci-dessus était susceptible de conserver la même intensité de teinte. Nous avons opéré sur 1 cc d'une solution de tyrosine à 0,32 % comparativement à 1 cc d'un solution de tyrosine à 0,40 %. En supposant cette dernière observée sous 10 $\frac{\text{mm}}{\text{m}}$, voici quels ont été les résultats :

Temps en minutes	Hauteurs lues en $\frac{m}{m}$
9	11,4 - 11,3
13	11,2 - 11,1
24	11,0 - 11,2 - 11,3 - 11,2
67	11,1 - 11,1

Nous avons même examiné des solutions conservées pendant plusieurs jours, nous avons obtenu les résultats suivants :

Temps	Hauteurs en $\frac{m}{m}$
20 minutes	7,4 - 8,0 - 7,6 - 7,6
7 jours	7,9 - 7,6 - 7,6

Le maximum d'intensité de coloration est donc très rapidement atteint, avant même le temps indiqué par Zuwerkalow. Il semble, de plus, que cette intensité ne varie pas au cours de la manipulation et qu'elle puisse se conserver intacte pendant plusieurs jours.

3° Essai de préparation d'un étalon coloré artificiel :

Nous avons pensé diminuer le nombre des causes d'erreur possibles en cherchant à établir un étalon coloré immuable, destiné à remplacer notre étalon à base de tyrosine, et dont l'intensité de coloration soit identique à celle de cet étalon. Ainsi nous serait-il possible, à chaque instant, de nous contrôler. Nous nous sommes servis d'un mélange de deux solutions, établi dans des conditions bien déterminées. Il reste, toutefois, bien évident que si l'on

voulait reproduire cet étalon artificiel, il serait nécessaire de vérifier à nouveau son intensité de coloration en le comparant à une solution donnée de tyrosine.

Nous avons utilisé deux solutions (1) :

L'une rose : N° 1 :

Chlorure de Cobalt à 10 %	10 cc
Bichromate de Potasse à 0,03 % Q. S. pour ..	250 cc
en solution dans l'acide acétique.	

L'autre jaune : N° 2 :

Nitrate de Cobalt à 20 %	5 cc
Bichromate de Potasse à 0,03 % Q. S. pour ..	250 cc

Comme la coloration à obtenir doit correspondre à celle que fournit le mélange suivant, nous servant habituellement d'étalon :

Solution de tyrosine à 0 gr. 4 %	1 cc.
Acide acétique (2)	3 cc.
SO ⁴ Hg	2 cc.
No ³ Na à 5 %	II gtes

il faut opérer le mélange suivant des solutions n^{os} 1 et 2 dans certaines proportions. Nous avons constaté, par tâtonnements, qu'il faut faire le mélange comme suit :

(1) Solutions établies par Bruère (voir *Journal de Pharmacie et de Chimie*, 1926, 3, 378, et 4, 241.

(2) Lorsque nous avons effectué cette réaction, il nous est plusieurs fois arrivé d'obtenir des précipitations abondantes et des décolorations rapides, dûes, comme nous avons pu nous en rendre compte, à l'emploi d'un acide acétique impur, contenant vraisemblablement de l'acétone ou de l'aldéhyde acétique. Cet acide acétique était cependant étiqueté comme pur et cristallisable.

46 cc. de la solution n° 1

14 cc. de la » » 2

et que, au colorimètre, il faut observer cet étalon artificiel sous $15,5 \frac{m}{m}$ si l'on veut avoir la même intensité de teinte que $10 \frac{m}{m}$ de solution de tyrosine étalon.

4° *Influence du nitrite de soude.*

Nous avons constaté que dans les conditions de réaction décrites par Zuwerkalow, c'est-à-dire en utilisant seulement une goutte de solution de nitrite de soude à 0 gr. 5 % la coloration ne s'établit pour ainsi dire pas, ou, qu'en tous cas elle reste jaune, et d'autant plus jaune que le tryptophane est plus abondant. Pour obtenir qu'une comparaison soit possible au colorimètre nous avons été amenés à porter à 2 le nombre de gouttes de cette solution. Dans ces conditions, la coloration cherchée s'établit de suite.

Cette quantité optima de nitrite de soude a été établie en effectuant la réaction sur une solution de tyrosine à 0 gr. 4 %. Nous avons pris comme étalon un mélange (tyrosine) ne contenant que 1 goutte de solution de nitrite de soude que nous avons observé sous $10 \frac{m}{m}$. Nous lui avons comparé un mélange (tyrosine) contenant 2 gouttes et un troisième mélange (tyrosine) contenant 3 gouttes de solution de nitrite de soude.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

	1 goutte NO ² Na	2 gouttes NO ² Na	3 gouttes NO ² Na
Hauteurs en $\frac{m}{m}$...	10	8,8 - 8,8 - 9,3 - 8,8	9,2 - 9,4 - 9,4 - 9,4

De même, avec une solution de caséine à 1 % nous avons constaté que cette quantité de nitrite de soude paraissait optima, et, qu'en tous cas un excès de ce sel ne nuisait pas à la réaction.

En effet, en comparant une solution étalon de tyrosine à 0 gr. 4 %, additionnée de 11 gouttes de solution de NO²Na et placée sous 10 $\frac{m}{m}$, avec cette solution de caséine, nous obtenons les résultats suivants :

Etalon Tyrosine		Caséine		
2 gouttes NO ² Na		1 goutte NO ² Na	2 gouttes NO ² Na	3 gouttes NO ² Na
1 ^{er} dosage (hauteurs en $\frac{m}{m}$)	10	7,8 - 8,2 - 8,0 - 8,2	5,4 - 5,8 - 5,9 - 5,4	5,8 - 5,6 - 5,8 - 5,8
2 ^e dosage (hauteurs en $\frac{m}{m}$)	10	7,6 - 7,8 - 7,9	5,2 - 5,7 - 5,1 - 5,9	5,5 - 5,8 - 5,7

5° Influence du tryptophane.

Nous avons ensuite tenu à nous rendre compte si le tryptophane ne gênait pas la réaction. Pour cela, nous avons effectué cette réaction sur des solutions de caséine à 1 % renfermant respectivement 0 gr. 4 % ; 0 gr. 3 % ; 0 gr. 2 % de tryptophane que nous avons comparées à une solution de tyrosine à 0 gr. 4 % additionnée de 11 gouttes de solution de nitrite de soude et placée sous 10 $\frac{m}{m}$.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

Titre en Tryptophane	Tyrosine Hauteurs en $\frac{m}{m}$	Caséine + Tryptophane Hauteurs en $\frac{m}{m}$
0,4 %	10	5,8 - 6,0 - 5,8 - 5,7
0,3 %	10	5,0 - 5,4 - 5,7 - 5,6
0,2 %	10	5,7 - 5,6 - 5,3 - 5,8

Nous constatons donc que quelle que soit la quantité de tryptophane ajoutée, les chiffres obtenus sont les mêmes et identiques à ceux obtenus plus haut pour la caséine pure. Le tryptophane ne semble donc pas gêner la réaction.

6° Influence de la soude destinée à dissoudre la protéine.

Au cours des divers essais que nous avons effectués, nous avons été conduits à dissoudre les matières protéiques dans de la soude, parfois assez concentrée ; ce qui fut le cas, par exemple, pour la caséine, l'édestine et la fibrine. Pour la caséine et la fibrine même, nous avons dû chauffer pour obtenir une dissolution. Or, à la suite de l'emploi de cette soude, à plusieurs reprises, nous ne sommes pas parvenus à la coloration rose caractéristique du Millon, mais à des teintes jaunes peu comparables au témoin et de plus nous avons obtenu des précipités abondants.

Nous avons d'ailleurs constaté que lorsque Zuwerkalow admettait que l'on dissolve les protéines dans la soude à 5 %, si la chose était nécessaire, il ne se rendait pas compte que cette soude entravait la réaction.

En effet, si nous effectuons la réaction sur un mélange de tyrosine effectué dans les conditions suivantes :

Solution de lessive de soude à 5 % en volume.	1 cc
Solution acétique (1) de tyrosine à 25 mg. %.	2 cc
Acide acétique pur	1 cc
Solution de Na^2Na à 0,5 %	II gtes.

Nous constatons que, par comparaison avec une solution étalon de tyrosine à 0 gr. 4 %, sur 0 mg. 50 de tyrosine mis en réaction, nous ne retrouvons que 0 mg. 43 — 0 mg. 41 de tyrosine, soit une perte de 14 à 18 pour 100.

Il est donc bien évident que la soude apporte un trouble dans cette réaction. Celui-ci est-il dû au fait que, lorsque nous chauffons les protéiques avec de la soude pour obtenir leur dissolution, il y a destruction partielle de la molécule ? Nous ne le croyons pas, car ce trouble se produit aussi bien lorsque l'on ne chauffe pas, comme dans l'exemple cité à propos de la tyrosine. D'autre part, nous verrons que bien des auteurs ont conseillé des hydrolyses de protéiques dans de la soude bien plus concentrée, à la température de l'ébullition et pendant des temps supérieurs à 15 heures sans que l'on éprouve aucune difficulté pour mener à bien cette réaction de Millon.

Nous croyons que la cause de ce trouble réside en la présence d'un système tampon gênant acétate de soude-acide acétique.

Pour nous en convaincre, nous avons opéré les essais suivants.

(1) Nous employons ici une solution acétique de tyrosine, de façon à conserver intégralement le volume de 3 cc. d'acide acétique indiqué par Zuwerkalow,

Nous avons effectué une première réaction sur le mélange suivant :

Lessive de soude ($D=1,332$) diluée au $1/10^{\circ}$

en volume	1 cc.
Solution acétique de tyrosine à 25 mg %...	2 cc.
Acide acétique pur	1 cc.
SO^4 Hg (solution de Hopkins)	2 cc.
Solution de NO^2 Na à 0,5 %	11 gtes.

Puis une 2^e réaction sur le mélange suivant :

<i>Eau distillée</i>	1 cc.
Solution acétique de tyrosine à 25 mg %...	2 cc.
Acide acétique pur	1 cc.
SO^4 Hg (solution de Hopkins)	2 cc.
NO^2 Na en solution à 0,5 %	11 gtes.

Nous avons comparé chaque mélange à notre étalon artificiel au cobalt, voici les résultats que nous avons obtenus :

Etalon artificiel Hauteurs en $\frac{m}{m}$	1 ^{re} réaction Hauteurs en $\frac{m}{m}$	2 ^e réaction Hauteurs en $\frac{m}{m}$
15,5	10,3	8,0

La hauteur théorique pour 0 mg 5 de tyrosine introduite étant de 8 $\frac{m}{m}$, on voit que la coloration obtenue en présence de NaOH mène à une teneur beaucoup trop faible (erreur de 20 % environ), on voit donc que le mélange tampon acétate de soude-acide acétique gêne la réaction.

Nous avons pensé que le remède, qu'il convenait d'apporter, pourrait consister en la neutralisation pure et simple de la soude par un acide fort avant l'addition d'acide acétique. Pour cela nous avons neutralisé la soude par de l'acide sulfurique de façon à faire un mélange sulfate de soude-acide acétique, lequel n'étant pas tampon ne devait pas gêner la réaction.

Nous avons fait un essai avec de la fibrine, nous avons dissout à chaud 5 milligrammes de ce corps dans un cc. d'une solution de soude à la concentration suivante : 20 cc. de lessive de soude ($D = 1,332$) dans 50 cc. d'eau.

A ce moment, nous devons tenir compte :

1° De ce que le volume total de notre prise d'essai ne devait pas être modifié, à cause de notre témoin artificiel ;

2° De ce que, par conséquent, l'acide sulfurique devait être ajouté au dépens de l'acide acétique ;

3° De ce que, enfin, ce dernier devait toutefois exister en quantité suffisante pour empêcher la précipitation de la fibrine par le sulfate mercurique.

Comme nous avons constaté que le volume minimum d'acide acétique devait être de 2 cc., si l'on veut éviter tout précipité, nous avons donc utilisé de l'acide sulfurique suffisamment concentré pour que la quantité nécessaire à la neutralisation ne dépasse pas 1 cc.

Nous avons suivi dans la préparation de notre réaction le processus suivant :

Fibrine	5 mg.
Solution de soude (concentration ci-dessus) .	1 cc.

Faire dissoudre, ajouter pour neutraliser :

SO^4H^2 , 5N	0 cc. 7
Acide acétique	2 cc. 3
SO^4Hg (solution de Hopkins)	2 cc.
Solution de $\text{NO}^2 \text{Na}$ à 0,5 %	II gtes.

En opérant ainsi l'on obtient une bonne coloration rose, sans précipité. De plus, dans cet exemple sur la fibrine, le pourcentage de tyrosine contenu dans cette fibrine fourni par ce procédé a été supérieur à celui obtenu avant la modification proposée ci-dessus. Ceci semble confirmer qu'il y a nécessité à neutraliser la soude nécessaire à la dissolution de la matière protéique.

7° Technique proposée :

On peut décrire la méthode ainsi définitivement modifiée de la façon suivante :

a) Cas d'une solution aqueuse non sodique de l'albuminoïde.

Opérer le mélange suivant :

Solution de l'albuminoïde à 1 %	1 cc.
Acide acétique	3 cc.
SO^4Hg (solution de Hopkins)	2 cc.
Solution de nitrite de soude à 0,5 % ...	II gtes.

Porter 1 minute au bain-marie bouillant et laisser reposer 15 minutes. Comparer au colorimètre de Dubosq avec une solution étalon de tyrosine à 0 gr. 40 % observée

sous 10 $\frac{m}{m}$. Le pourcentage en tyrosine de l'albuminoïde considéré est donné par la formule suivante :

$$\frac{x}{0,4} = \frac{a'}{a}$$

x étant le pourcentage calculé.

a' étant la hauteur sous laquelle on observe l'étalon.

a étant la hauteur sous laquelle on observe la solution étudiée.

b) Cas d'une solution aqueuse sodique de l'albuminoïde.

Opérer le mélange suivant :

Solution sodique de l'albuminoïde à 1 % 1 cc.

SO⁴H² 5N, quantité suffisante pour neutraliser ($\leq$ 1 cc.)

Acide acétique, quantité suffisante pour 3 cc. ($\geq$ 2 cc.)

SO⁴ Hg (solution de Hopkins) 2 cc.

Solution de nitrite de soude à 0,5 % 11 gtes.

Porter 1 minute au bain-marie bouillant et laisser reposer 15 minutes. Comparer au colorimètre de Duboscq avec une solution étalon de tyrosine à 0 gr. 40 pour 100 observée sous 10 $\frac{m}{m}$ comme dans le paragraphe précédent.

Remarque :

On peut remplacer la solution étalon de tyrosine par une solution étalon artificielle au cobalt, comme nous l'avons vu dans un paragraphe antérieur (page 34).

8° *Vérification de la méthode :*

a) Nous avons appliqué la méthode de Zuwerkalow à des solutions de tyrosine afin de vérifier qu'il y avait bien proportionnalité entre les colorations développées et les quantités de tyrosine mises en jeu.

Nous avons opéré deux solutions aqueuses de tyrosine, l'une à 0 gr. 26 %, l'autre à 0 gr. 53 % que nous avons comparées après réaction à notre étalon artificiel au cobalt. Nous savons qu'une hauteur de 15,5 $\frac{m}{m}$ de cette solution correspond à 10 $\frac{m}{m}$ d'une solution de tyrosine à 0 gr. 40 %. Dans nos calculs nous avons remplacé ce chiffre de 15 $\frac{m}{m}$ par 10 $\frac{m}{m}$.

Voici les résultats que nous avons obtenus :

Etalon coloré Hauteurs en $\frac{m}{m}$	Solution de Tyrosine Hauteurs en $\frac{m}{m}$
1 ^{er} dosage (0,26 %)..... 15,5	14,2 - 13,6 - 13,8 - 14,5 moy. 14,0
2 ^e dosage (0,53 %)..... 15,5	7,4 - 8,0 - 7,6 - 7,6 moy. 7,6

Calculs :

$$1^{er} \text{ dosage : } \frac{x}{0,4} = \frac{10}{14,0}$$

$x = 0 \text{ gr. } 28 \% \text{ au lieu de } 0 \text{ gr. } 26 \% \text{ mis en œuvre.}$

$$2^{e} \text{ dosage : } \frac{x}{0,4} = \frac{10}{7,6}$$

$x = 0 \text{ gr. } 52 \% \text{ au lieu de } 0 \text{ gr. } 53 \% \text{ mis en œuvre.}$

Il semble donc que les colorations développées sont bien proportionnelles aux quantités de tyrosine mises en œuvre.

b) Nous avons ensuite ajouté de la tyrosine à de la caséine et nous avons effectué la réaction sur le mélange des deux afin de vérifier si nous retrouvions bien cette tyrosine ajoutée.

Mais d'abord nous avons fait un essai sur une solution de caséine à 1 %.

Voici les résultats que nous avons obtenus :

Etalon coloré		Solution de caséine	
Hauteurs en $\frac{m}{m}$		Hauteurs en $\frac{m}{m}$	
1 ^{er} dosage.....	15,5	5,6 - 5,8 - 5,9 - 5,8	moyenne 5,7
2 ^e dosage	15,5	5,6 - 6,1 - 5,8 - 6,0	moyenne 5,8
3 ^e dosage	15,5	5,4 - 5,4 - 5,9 - 5,6	moyenne 5,5

Moyenne générale 5,6 qui correspond à une teneur de 0 mg. 47 pour 1 cc. de prise d'essai. Or, après calcul, en tenant compte du pourcentage de la caséine en tyrosine de 7,14 % trouvée précédemment, il y a théoriquement dans la prise d'essai de 1 cc. : 0 mg. 13 + 0 mg. 35 = 0 mg. 48 de tyrosine. Nous avons, de même, additionné 1 cc. d'une solution sodique de caséine La Roche, dont la teneur en tyrosine était de 6,46 %, de 0 mg. 19 de tyrosine. La tyrosine retrouvée était de 0 mg. 15.

On peut donc admettre la réaction de Zuwerkalow ainsi modifiée comme assez exacte puisque, à peu de choses près, elle nous a permis de retrouver la presque totalité de la tyrosine ajoutée à des solutions diverses de matières protéiques.

9° *Résultats obtenus :*

Nous avons appliqué cette méthode à diverses matières albuminoïdes et nous avons obtenu les résultats suivants que nous avons groupés avec les chiffres trouvés par Zuwerkalow.

Pourcentage en tyrosine :

Par notre procédé	Selon Zuwerkalow
Fibrine 7,7	
Edestine de chènevis 6,45 - 5,52 - 5,20	4,9 - 5,0 - 4,8 - 4,8
Sérum globuline... 7,57 - 6,23	
Sérum albumine... 5,56	
Gélatine 0,36 - 0,23	
Albumine d'œuf... 5,60	4,2 - 4,8 - 4,4
Caséine (Bouchara) 7,8	
Caséine (Levaltier) 7,14 - 8,0 - 7,08	6,8 - 6,8 - 7,2 - 6,8
Caséine (Roche).. 6,52 - 6,46	

On voit que dans l'ensemble nous trouvons des chiffres plus élevés que ceux de Zuwerkalow.

CHAPITRE II

ÉTUDE DE LA DÉTERMINATION D'UN INDICE DE FOLIN SELON GREENBERG

Nous avons passé en revue, dans un chapitre précédent, les diverses méthodes qui utilisent un réactif phosphomolybdotungstique. Nous avons vu que la tyrosine et le tryptophane participaient l'un et l'autre à cette réaction et que pour les doser séparément il convenait auparavant d'éliminer l'un ou l'autre. Certains auteurs, tel Thomas [29], ont prétendu que d'autres corps réducteurs entraient en même temps en réaction. Quoiqu'il en soit, l'on pourrait, sans chercher à séparer la tyrosine et le tryptophane, essayer cette réaction colorée sur les matières protéiques pour établir un indice global de tyrosine et de tryptophane exprimé en tyrosine et caractéristique de chaque substance protéique. Greenberg, comme nous l'avons vu plus haut, a décrit un procédé très simple répondant exactement à ce but, procédé dans lequel il admet qu'en principe le réactif phénolique phosphomolybdotungstique de Folin et Ciocalteu [5] réagit également sur les acides aminés des matières protéiques, que ces derniers soient à l'état de combinaison plus ou moins complexe, ou qu'ils soient libres.

Nous avons donc entrepris d'établir des indices phénoliques que nous appellerons « indices de Folin », en utilisant la technique suivante fixée par l'auteur.

Technique de la méthode :

1. — *Préparation du réactif phosphomolybdotungstique*

Greenberg utilise le réactif dont la préparation a été décrite par Folin et Ciocalteu [5].

Introduire 100 grammes de tungstate de soude et 25 grammes de molybdate de soude dans un ballon de 1 litre 500 environ avec 570 cc. d'eau. Verser ensuite 50 cc. d'acide phosphorique à 85 % avec 120 cc. d'acide chlorhydrique concentré. Faire bouillir 10 heures au réfrigérant à reflux. A la fin de l'ébullition ajouter 150 gr. de sulfate de lithium, puis une dizaine de gouttes d'eau bromée et faire bouillir 10 minutes sans réfrigérant pour chasser l'excès de brome et pour arriver à un volume de 1.000 cc. (1).

Dans ces conditions l'on obtient un liquide d'un beau jaune d'or, qui laisse déposer un léger précipité cristallin, ce qui ne gêne d'ailleurs nullement la réaction.

(1) Comme nous ne possédions pas de molybdate de soude, nous avons utilisé 17 grs d'anhydride molybdique et 33 grs de lessive de soude à $D = 1,332$, en ayant pris soin d'éliminer l'ammoniaque préexistant toujours dans les produits commerciaux de MoO_3 , et ce en faisant bouillir MoO_3 avec un excès de soude. Nous avons remplacé les 150 grs de sulfate de lithium par 100 grs de carbonate de lithium additionnés de 143 grs d'acide sulfurique à $D = 1,833$, le tout dissout dans 50 cc. d'eau.

2. — *Préparation de la solution standard de tyrosine.*

Greenberg indique la formule suivante :

20 mg. de tyrosine et 1.000 cc. de HCl 0,1 N.

Il semble que l'acide chlorhydrique décimal soit employé afin d'éviter que la solution de tyrosine ne cultive.

En réalité, on peut employer des concentrations supérieures, à condition de ne pas dépasser la limite de solubilité, ainsi que des solutions dans l'eau distillée. Il est toutefois indispensable de veiller à ce que la quantité de tyrosine soit suffisante pour développer une coloration bleue et non verte.

3. — *Mode d'emploi :*

Pour la réaction elle-même, la marche à suivre est la suivante :

Substance protéique	de 20 à 40 mgr.
Eau	20 cc. environ.
Na OH 5 N	2 cc.
Réactif de Folin et Ciocalteu. . .	2 cc.
Eau Q. S. pour	50 cc.

Laisser la coloration se développer pendant 2 heures. On prépare avec la tyrosine une réaction identique, en prenant soin que la quantité de tyrosine mise en œuvre soit sensiblement égale à celle contenue dans la substance protéique elle-même.

Pour Greenberg la concentration optima de matière protéique doit être comprise entre 20 et 40 mgr. pour 50 cc.

et dans ces conditions une teinte bleue doit s'établir, sinon recommencer l'essai en augmentant la quantité de substance protéique.

Étude critique de la méthode :

1. — Mode opératoire.

Il faut avoir grand soin de ne pas verser trop rapidement les 2 cc. de réactif des phénols. Si en effet, le réactif se trouve en excès dans un point déterminé de la masse de liquide, il se développe un précipité abondant, aux dépens de la coloration finale.

Faute de procéder de cette manière, nous avons obtenu des résultats presque tous entachés d'erreur, jusqu'au jour où nous avons dilué ces 2 cc. de réactif dans 10 cc. d'eau et les avons versés peu à peu, en agitant constamment. Nous n'avons jamais plus, depuis lors, observé de précipité.

2. — Vérification de l'exactitude des résultats.

Pour nous assurer de l'exactitude de nos résultats, nous avons pensé que si à ces diverses matières protéiques nous ajoutions des quantités connues de tyrosine, nous devrions obtenir un chiffre global de tyrosine correspondant à la somme d'une part de la tyrosine contenue dans la matière albuminoïde et d'autre part de celle ajoutée en second lieu.

L'expérience nous a prouvé que dans les conditions

où nous opérions, l'on ne pouvait jamais retrouver la tyrosine ajoutée et que plus la quantité de tyrosine ajoutée était grande, plus l'écart entre le chiffre théorique et le chiffre trouvé était considérable. Il en est ainsi pour la caséine, l'édestine, la gélatine, l'albumine d'œuf et la fibrine.

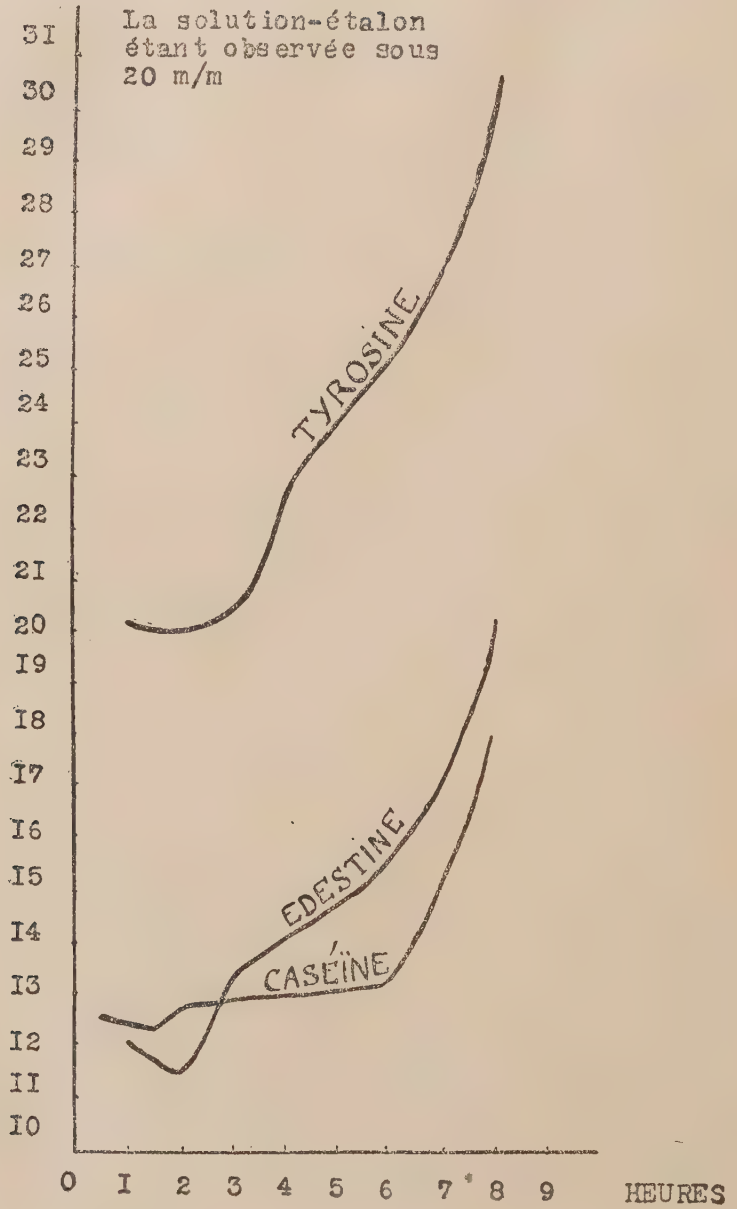
Cherchant donc la cause de ces erreurs constantes, nous nous sommes d'abord demandé si le temps de réaction de 2 heures préconisé par l'auteur était bien le temps optimum, et si le temps ne variait pas d'une protéine à l'autre. Car s'il est bien de 2 heures pour la tyrosine, l'est-il encore pour la caséine, l'édestine, la gélatine, etc..., et de ce fait ne se produit-il pas une sorte de décalage, au point de vue de la coloration maxima, entre la tyrosine et la protéine, lorsque nous mélangeons la tyrosine, donnant son maximum d'intensité au bout de 2 heures, et la protéine, la donnant au bout d'un temps différent.

3. — *Evolution de l'intensité de coloration en fonction du temps.*

Nous avons donc entrepris de mesurer pour chaque protéine l'intensité de la réaction à des temps variables et nous avons établi des courbes d'intensité en fonction du temps et en fonction des chiffres lus sur le colorimètre.

Ces courbes sont légèrement différentes les unes des autres. Elles ont cependant une allure générale identique, faisant ressortir un maximum d'intensité à des temps compris entre 1 heure 1/2 et 2 heures.

HAUTEUR EN M/M



Le décalage dont nous parlions plus haut ne se produit donc pas et là n'est pas la cause d'erreur.

4. — *Influence de la quantité de réactif.*

L'étude systématique de l'influence de la quantité de réactif nous a montré la cause de nos erreurs. Elle réside dans une insuffisance de réactif dans le cas où nous ajoutons une surcharge en tyrosine.

Nous avons pour cela successivement envisagé une série d'hypothèses que nous avons soumises à la vérification.

Nous avons pensé à voir à quelle phase de la réaction se produit cet empêchement, avec une solution contenant 74 mgr. 3 de gélatine (1) dans 5 cc. et amenée en fin de réaction à un volume de 50 cc. et avec une solution de tyrosine telle, que pour le volume de fin de réaction, elle en contienne 0 mgr. 8.

Nous avons fait réagir chaque solution séparément, nous les avons comparées au bout de 2 heures, nous avons mélangé des volumes égaux de chacune d'elles et nous avons comparé le mélange à la tyrosine primitive. Nous avons constaté que l'intensité de coloration du mélange est égale à la somme des intensités de chaque solution séparée. Donc, c'est bien au moment où le réactif phosphomolybdotungstique entre en réaction que l'erreur s'établit.

Nous avons poursuivi nos investigations dans ce

(1) Le pourcentage de gélatine que nous avons calculé pour cette réaction ainsi que pour les autres, a été obtenu en multipliant le chiffre d'azote total correspondant par le coefficient moyen : 6,25, également appliqué aux autres matières protéiques.

domaine en opérant sur des mélanges d'édestine et de tyrosine. Nous avons cherché à établir si l'édestine empêchait la tyrosine de réagir ou si la tyrosine gênait l'édestine. Nous avons fait agir le réactif sur l'édestine, puis une minute après nous avons ajouté la tyrosine. Nous avons fait l'opération inverse en ajoutant de l'édestine à la tyrosine réagissant déjà depuis une minute. Nous avons constaté que dans chaque expérience l'addition faite en second lieu ne provoquait aucune nouvelle coloration, et que par conséquent le corps ajouté en second lieu ne réagissait pas.

Devant ces résultats, nous nous sommes donc demandés si la quantité de réactif entrant en jeu était suffisante.

Nous avons alors repris nos essais, en opérant sur une solution d'édestine à 1 gr. %. On constate que 5 cc. de cette solution renferment 2 mgr. 67 de tyrosine. En recommençant cette opération sur 5 cc. de la même solution et en ajoutant, après addition du réactif, 1 mgr. 20 de tyrosine et en même temps 1 cc. de réactif, nous avons constaté que la tyrosine ajoutée réagit, que de 2 mgr. 67 la teneur en tyrosine de ces 5 cc. de solution passe à 4 mgr. 21, alors que, normalement, elle n'aurait dû être que de $2,67 + 1,20 = 3$ mgr. 87. Donc ce centimètre cube supplémentaire de réactif a non seulement été utilisé par la tyrosine ajoutée, mais encore par l'édestine ; ce qui laisse donc supposer que le chiffre habituel de 3 cc. est insuffisant et que pour chaque protéine étudiée nous devrions trouver un indice de tyrosine supérieur à ceux déterminés jusqu'alors. On comprend donc maintenant

pourquoi nous ne retrouvions pas l'intégralité de la tyrosine que nous ajoutions à nos diverses solutions de protéines : c'est que nous n'utilisions pas suffisamment de réactif.

Nous avons donc repris nos expériences avec 5 cc. de solution d'édestine à 1 % en prenant 4 cc. de réactif au lieu de 3 ; dans d'autres essais, nous avons diminué la quantité d'édestine en laissant la quantité primitive de réactif. Voici les indices de tyrosine que nous avons calculés :

	1 ^{er} essai	2 ^e essai	3 ^e essai
Edestine à 1 %.....	5 cc.	4 cc.	3 cc.
Réactif	4 cc.	3 cc.	3 cc.
Indices de tyrosine % en milligrammes	6,02	5,80	6,32

On peut donc dire que les conditions optima de réaction sont celles qui mettent en présence 30 mgs d'édestine avec 3 cc. de réactif.

Il résulte de ces expériences que, dans chaque cas, il faudra s'efforcer d'opérer pour chaque matière protéique dans le voisinage de ces conditions optima, c'est-à-dire employer une quantité de réactif suffisante pour révéler toute la tyrosine, mais insuffisante cependant pour donner une teinte verte. En particulier, lorsque nous voudrions vérifier par addition de doses croissantes de tyrosine les indices que nous aurons déterminés pour chaque protéine, il ne faudra pas que la somme globale de la tyrosine entrant dans chaque réaction s'élève au-dessus du chiffre maximum au-delà duquel les 3 cc. de réactif se sont révélés insuffisants.

Par exemple, lorsque, au cours des trois essais précédents, nous avons fait la réaction sur 50 mgr. d'édestine, le plus grand indice de tyrosine trouvé est un maximum pour nos 3 cc. de réactif. De là, il s'ensuit que si nous voulons refaire la réaction en ajoutant de la tyrosine à de l'édestine, il faudra que la concentration

du mélange en tyrosine ne dépasse pas $\frac{6,32}{2} = 3 \text{ mgr. } 16$

pour les 50 cc. sur lesquels nous opérons. Dans ces conditions notre réactif étant en quantité suffisante, nous devons retrouver toute la tyrosine ajoutée.

5. — *Vérification de la méthode ainsi modifiée.*

Nous avons constaté que les conditions optima de réaction sont celles qui mettent en présence, pour :

	l'Edestine	la Caséine	l'Albumine d'œuf	la Gélatine
Poids d'albumine totale en milligr.	3,16	10,00	14,6	28,5
Réactif en centimè- tres cubes.....	3	3	3	3
Indice de tyrosine % en milligr....	6,32	6,80	8,82	1,09

Nous avons alors opéré des additions croissantes de tyrosine à ces protéines, dont nous connaissons maintenant la teneur exacte en tyrosine. Il nous a été facile de calculer le poids total de tyrosine entrant en réaction, et de voir ensuite ce que la réaction donne.

1° Pour l'édestine :

Mélange (en milligrammes) de	Tyrosine en milligrammes	
	Calculée	Trouvée
A. Edestine 30 mg. + Tyrosine 0 mg. 40	1,78 + 0,40 = 2,18.	2,19
B. Edestine 20 mg. + Tyrosine 1 mg. 20	1,19 + 1,20 = 2,39	2,46
C. Edestine 10 mg. + Tyrosine 1 mg. 60	0,58 + 1,60 = 2,18	2,19

2° Pour la caséine :

Mélanges de	Tyrosine en milligrammes	
	Calculée	Trouvée
A. Caséine 8 mg. + Tyrosine 0 mg. 12	0,54 + 0,12 = 0,66	0,66
B. Caséine 5 mg. + Tyrosine 0 mg. 28	0,34 + 0,28 = 0,62	0,62
C. Caséine 3 mg. + Tyrosine 0 mg. 40	0,20 + 0,40 = 0,60	0,60

3° Pour l'albumine d'œuf :

Mélanges de	Tyrosine en milligrammes	
	Calculée	Trouvée
A. Albumine 14 mg. 62 + Tyrosine 0 mg. 6	1,29 + 0,60 = 1,89	1,83
B. Albumine 5 mg. 78 + Tyrosine 1 mg.	0,51 + 1,00 = 1,51	1,50

4° Pour la gélatine :

Mélanges de	Tyrosine en milligrammes	
	Calculée	Trouvée
A. Gélatine 6 mg. 90 + Tyrosine 0 mg. 24	0,07 + 0,24 = 0,31	0,31
B. Gélatine 13 mg. 80 + Tyrosine 0 mg. 16	0,15 + 0,16 = 0,31	0,31
C. Gélatine 22 mg. 93 + Tyrosine 0 mg. 08	0,25 + 0,08 = 0,33	0,32

En général on retrouve donc bien toute la tyrosine ajoutée, et l'on peut considérer la méthode comme satisfaisante.

Résultats :

Nous avons, grâce à cette méthode, établi pour diverses protéines des indices « de Greenberg » que nous donnons dans le tableau suivant :

	Indice de tyrosine %
Edestine de chènevis	6,32
Caséine (Roche)	6,80
Albumine d'œuf	8,82
Gélatine	1,09
Fibrine	7,77

Conclusion :

Le procédé de Greenberg, d'exécution facile, conduit à des résultats constants, à condition, comme nous l'avons montré, de déterminer au préalable la quantité optimale de réactif.

Les résultats qu'elle donne sont, comme on le voit, légèrement supérieurs à ceux que fournit la technique de Zuwerkalow (voir p. 46). Il est vrai que nous dosons par ce moyen la somme des deux acides aminés tyrosine et tryptophane. De plus, ces deux derniers ne réagissent pas d'une façon identique, la tyrosine se colorant d'une façon plus intense que le tryptophane. Il n'est donc pas

étonnant que les chiffres obtenus soient supérieurs à la tyrosine réelle.

On ne doit donc demander à cette méthode que de nous fournir un indice, et dans ce sens, elle est assimilable à la technique de Zuwerkalow.

CHAPITRE III

EMPLOI DE LA RÉACTION XANTHOPROTÉIQUE POUR LE DOSAGE DE LA TYROSINE ET DU TRYPTOPHANE selon la méthode de J. Tillmann, P. Hirsh et F. Stoppel

Nous avons déjà étudié cette méthode dans ses grandes lignes au début de ce travail. Nous nous bornerons donc maintenant à faire la critique de ce procédé, phase par phase, et à exposer les modifications que nous avons cru devoir lui faire subir, ainsi que les résultats que nous avons obtenus.

1. - Principe de la méthode :

Le principe de cette méthode est le suivant : faire subir aux matières protéiques l'action de l'acide azotique dans certaines conditions ; amener la liqueur obtenue à un pH déterminé puis à un second pH ; comparer à chaque fois la coloration jaune obtenue à une solution jaune étalon appropriée, et déduire de la comparaison des deux intensités de coloration, par un calcul déterminé, les quantités de tyrosine et de tryptophane contenues dans la prise d'essai, connaissant la loi de variation de

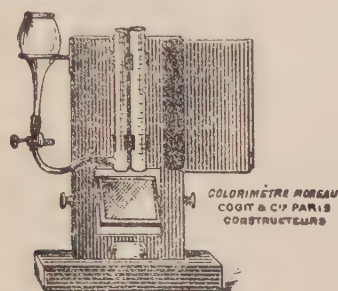
la couleur en fonction du pH de chacun de ces deux acides aminés ainsi que leur équivalent, après nitration, vis-à-vis d'un colorant de référence : le m. nitro-phénol.

2. - Choix de l'appareil colorimétrique :

Tillmann, Hirsh et Stoppel emploient pour la comparaison des teintes des éprouvettes graduées de grandes dimensions, dites de « Hehner ». N'ayant pu nous procurer ces éprouvettes, nous avons pensé qu'il serait très simple, en faisant subir aux lectures et aux calculs les modifications convenables, d'employer le colorimètre de Duboscq, ceci dans le but d'opérer comme pour la réaction de Zuwerkalow et d'unifier ainsi les deux méthodes. Malheureusement la chose est totalement impossible, en particulier lorsqu'on arrive à des pH faibles, tels que le pH 1,8. En effet l'intensité de coloration devient si minime qu'il faudrait des tubes d'au moins 10 $\frac{\text{cm}}{\text{m}}$ de hauteur, pour pouvoir la comparer à la solution étalon même diluée. C'est pourquoi, dans les recherches qui vont suivre, nous avons utilisé le colorimètre de Moreau.

Rappelons le principe de cet appareil. Il est constitué par un support de bois maintenant verticaux au moyen de griffes métalliques deux tubes de verre de même diamètre, de 12 centimètres de hauteur environ, gradués en centimètres et placés côte à côte. On peut éclairer le fond de ces deux tubes au moyen d'un miroir placé à la base du socle de bois. L'un des tubes porte à son extrémité inférieure et latéralement une ouverture qui le fait

communiquer par un tuyau de caoutchouc à un réservoir de verre que l'on peut déplacer verticalement. Une pince d'arrêt permet d'obturer le tuyau de caoutchouc au moment voulu. Il suffit donc de placer la liqueur colorée dans le premier tube, à une hauteur déterminée, d'introduire dans le réservoir la solution étalon, l'observateur plaçant l'œil à la partie supérieure des deux tubes, de



façon à ce que le regard puisse les embrasser en même temps. On fait arriver dans le deuxième tube, en soulevant ou en baissant le réservoir, la quantité de solution étalon nécessaire pour obtenir l'égalité de teintes dans les deux tubes. On peut éviter de déplacer le réservoir en bouchant ce dernier d'un bouchon muni d'un tube de caoutchouc, au moyen duquel l'opérateur peut aspirer convenablement le liquide et le porter à des hauteurs variables.

3. - Solution étalon. - Sa stabilité :

Les auteurs obtiennent une solution jaune type en dissolvant 50 milligrammes de métanitrophénol cristallisé (point de fusion 96°) dans 500 cc. de soude décimale.

Nous avons essayé deux échantillons de métanitro-

phénol dont les points de fusion respectifs étaient de 97° et de 94° 5 au bain d'huile. Nous n'avons pas observé entre eux de différence de coloration, après dissolution dans de la soude 0,1 N.

Conservation. — Nous avons comparé au colorimètre de Moreau diverses solutions étalons conservées dans des flacons jaunes plus ou moins exposés à la lumière du jour ou du soleil, et pendant des périodes plus ou moins longues, avec des solutions de méτανitrophénol récentes et conservées à l'obscurité. Voici les résultats que nous avons obtenus :

Durée de la conservation	Solution type à l'obscurité Hauteurs en cm.	Solution en flacon jaune lumière vive et soleil Hauteurs en cm. pour égalité de teintes	Solution en flacon jaune lumière du jour atténuée Hauteurs en cm. pour égalité de teintes
7 jours ...	2,0	1,95 - 2,00 - 2,10	
13 jours ...	2,0	1,80 - 2,20 - 2,05	
33 jours ...	2,0		2,40 - 2,35 - 2,20 - 2,00 - 2,20
46 jours ...	2,0		2,20 - 2,15 - 2,20
3 mois envir.	2,0		2,10 - 2,10 - 2,20

La conservation paraît donc suffisante pour que l'on puisse se permettre de ne renouveler la solution étalon que tous les 30 jours environ.

4. - La réaction colorée. - Les conditions de sa formation :

Tillmann et ses collaborateurs conseillent, pour la mise en œuvre de la réaction, de faire des solutions de tyrosine et de tryptophane selon les proportions suivantes :

Dissoudre 25 mgr. de tyrosine ou de tryptophane dans 100 cc. d'acide azotique 0,1 N et laisser la solution au bain-marie bouillant pendant 2 heures.

Les auteurs insistent sur la durée du séjour au bain-marie bouillant pendant 2 heures, ce temps leur paraissant optimum pour l'intensité de la coloration des solutions.

Au bout de ce temps neutraliser à la touche au tournesol et compléter à 500 cc. Dans ces conditions le pH doit être 7. Chaque solution sert ensuite de solution mère pour la fabrication des solutions à pH inférieurs ou supérieurs.

Nous nous sommes proposés de suivre cette méthode et de la vérifier sur de la tyrosine et sur du tryptophane.

Alors que, aussitôt placée au bain-marie bouillant, la solution de tyrosine dans de l'acide azotique décimal préparé avec de l'acide azotique pur prend une teinte jaune qui s'accroît peu à peu par la suite, nous avons, dès l'abord, remarqué que la solution de tryptophane, dans les mêmes conditions, reste absolument incolore, même si on la laisse au bain-marie bouillant pendant 2 ou 3 heures. Nous avons refait cet essai plusieurs fois en suivant scrupuleusement les données des auteurs et jamais nous n'avons pu obtenir la moindre coloration. Cela nous a d'autant plus étonné que tous les auteurs que nous avons consultés à ce sujet mentionnent la réaction xanthoprotéique sur le tryptophane et ne paraissent pas avoir subi aucune difficulté à son exécution.

Influence de la concentration de l'acide nitrique.

Ce résultat très nettement en contradiction avec

Tillmann et ses collaborateurs nous a fort surpris, et cela d'autant plus que, comme nous l'avons dit dans notre historique, il paraissait bien établi que le tryptophane était susceptible de donner lui aussi une réaction xantho-protéique qui d'ailleurs se comportait différemment de la réaction fournie par la tyrosine lorsqu'on alcalinisait le milieu.

Cependant une remarque de Mörner [23, note de la page 204] avait attiré notre attention. Ce dernier dit en effet que, après chauffage de 5 minutes, 5 milligrammes de tryptophane dissous dans 10 cc. d'acide azotique dilué ne donnent aucune coloration quand la quantité d'acide azotique pur contenu dans ces 10 cc. n'atteint pas 0 cc. 5.

Aussi nous fûmes amené à penser que dans cette réaction la concentration de l'acide azotique intervenait peut-être. C'est pourquoi nous avons institué une série d'expériences dans lesquelles nous fûmes réagir une quantité constante de tryptophane avec une quantité également constante d'acide azotique en faisant varier simplement la concentration de cet acide.

Voici comment furent réalisées ces expériences : Dans une série de tubes à essais de $15 \frac{\text{cm}}{\text{m}} \times 15 \frac{\text{mm}}{\text{m}}$ de diamètre nous introduisons 0 cc. 2 d'une solution de NO^3H 10N et une quantité d'eau variable pour chaque tube. Ayant ainsi constitué une gamme où la même quantité de NO^3H se trouvait en une dilution graduellement croissante, nous ajoutions, dans chaque tube, 0 cc. 25 d'une solution de tryptophane à 2 grammes pour 100 cc., soit 5 milligrammes. Tous les tubes étaient portés en même temps au bain-marie bouillant et l'on notait le changement de teinte

en fonction du temps. Au bout de 10 minutes, on refroidissait les tubes et on les complétait à 20 cc. Voici en un tableau le résumé de nos expériences :

Chaque tube contenant 0 cc. 2 de $\text{No}^3\text{H}10\text{N}$ et 5 mg. de tryptophane				
Epreuve N°	Cm3 d'eau introduits avant chauffage	Titre de de No^3H	Couleur	Au bout de
1	0	10 N	jaune foncé brunât.	1 minute
2	2	N	jaune foncé	5 »
3	5	0,4 N	jaune	5 »
4	7,5	0,266 N	à peine coloré	45 »
5	10	0,2 N	incolore	45 »
6	20	0,1 N	incolore	45 »

Les teintes obtenues en 1, 2 et 3 sont comparables. La teinte obtenue avec le tube 4 est très faible. La conclusion qui se dégage de ces expériences c'est que pour que la réaction xanthoprotéique se produise avec le tryptophane, il est nécessaire que la concentration de l'acide nitrique ne soit pas inférieure à un titre déterminé, qui est compris entre 0,4N et 0,266N, soit en No^3H 25 gr. 2 et 16 gr. 8 par litre.

Donc s'il est exact que le tryptophane donne la réaction xanthoprotéique, celle-ci ne se produit qu'en un milieu nitrique de concentration en acide bien plus élevé que pour la tyrosine. Nous nous expliquons donc que dans les conditions indiquées par Tillmann, Hirsh et Stoppel, il nous ait été impossible d'obtenir cette réaction, mais nous ne pouvons expliquer comment les auteurs obtiennent cette réaction dans les conditions spécifiées par eux.

Addition de nitrite de sodium.

Par contre, même en milieu nitrique décimal, nous avons obtenu immédiatement une coloration jaune en ajoutant du *nitrite de sodium*.

On peut, d'ailleurs, dans cette réaction substituer l'acide sulfurique à l'acide nitrique : on obtient des colorations aussi bien pour le tryptophane que pour la tyrosine. Malheureusement ces dernières sont peu comparables à la solution de m-nitrophénol, en particulier pour la tyrosine.

Doses optima de nitrite de sodium.

Nous avons essayé de fixer la dose optima de nitrite de sodium nécessaire à la réaction xanthoprotéique sur le tryptophane, en opérant avec des doses croissantes de NO^2Na .

A des volumes constants d'une solution de tryptophane à 25 milligrammes pour 100 cc. de $\text{NO}^3\text{H O,1N}$ nous avons ajouté des quantités variables de nitrite de sodium. Pour une quantité inférieure à 1 milligramme pour 100 cc. de solution nitrique de tryptophane, nous n'avons obtenu aucune coloration. Cette dernière ne s'est développée qu'à partir de cette dose, toutefois elle ne fut que très faible et ce jusqu'à la dose de 0 gr. 05. A partir de cette quantité la teinte s'est établie d'une façon très nette. Nous avons condensé nos observations dans le tableau suivant :

SOLUTION DE TRYPTOPHANE OBSERVÉE SOUS 5 %_m
ET ADDITIONNÉE POUR 100 cm³ DE SOLUTION NITRIQUE DE :

	NO ² Na 0 g. 05	NO ² Na 0 g. 10	NO ² Na 0 g. 20	NO ² Na 0 g. 40	NO ² Na 0 g. 60	NO ² Na 0 g. 85
Solution de m. nitro- phénol à 10 mgr. p. 100 cc. dilué au tiers, pour éga- lité de teintes.	4,7-4,5 5,0-5,2 M=4,8	5,5-5,5 5,6 M=5,5	7,1-7,3 7,6-7,5 7,7-8,0-8,0 M=7,5	8,8-8,3 8,7-8,6 M=8,6	6,3-7,1-6,2 6,0 M=6,6	Teintes non compa- rables

Nous avons ainsi constaté que la quantité optima de nitrite de sodium pour le tryptophane était de 0 gr. 40.

Nous avons opéré les mêmes essais pour la tyrosine et nous avons constaté que non seulement l'addition de nitrite de sodium ne nuisait pas au développement de la coloration, mais que, au contraire, une quantité de sodium égale à 0 gr. 20 provoquait la réaction la plus intense. C'est pourquoi nous avons adopté pour la tyrosine et le tryptophane la quantité de 0 gr. 20 de nitrite de sodium.

Durée du séjour au bain-marie.

Nous avons constaté qu'en présence de nitrite de sodium le temps de séjour au bain-marie bouillant de 2 heures amenait, en particulier pour le tryptophane, une altération des solutions qui rendait leur coloration tout à fait impropre à des comparaisons avec le m-nitrophénol. La tyrosine au contraire n'a pas paru souffrir de ce séjour prolongé au bain-marie ; elle atteignait d'ailleurs son maximum de coloration bien avant les deux heures prévues.

Nous avons donc étudié pour le tryptophane les variations de l'intensité de coloration en fonction du temps de séjour au bain-marie bouillant et avons appliqué à la tyrosine les conclusions que le tryptophane nous a suggérées.

Nous avons opéré sur 25 milligrammes de tryptophane en solution dans 100 cc. de NO^3H 0,1N, additionnés de 0 gr. 20 de nitrite de sodium, puis nous avons neutralisé selon la méthode décrite précédemment, le pH final étant donc théoriquement de 7.

Voici les résultats que nous avons obtenus :

Temps de séjour au bain-marie bouillant.	Solution de tryptophane (Hauteurs en centimètres).	Solution de m. nitrophénol diluée au tiers. Hauteur en centimètres pour égalité de teintes.
20 minutes	5	7,7 - 7,4 - 8,0 - 7,9 M = 7,7
50 minutes	5	8,4 - 8,1 - 8,9 - 8,7 M = 8,5
60 minutes	5	7,1 - 7,3 - 7,6 - 7,0 - 7,5 - 7,7 - 8,0 - 8,0 M = 7,5
90 minutes	5	7,6 - 8,1 - 7,9 - 7,8 M = 7,8
120 minutes	5	6,2 - 6,8 - 6,8 - 6,7 M = 6,6
		Parfois teintes non comparables.

Nous avons ainsi constaté que le meilleur temps de séjour au bain-marie était de 50 minutes. Nous avons adopté le chiffre de 45 minutes de bain-marie bouillant.

Remarques sur la neutralisation des solution nitrées.

Pour neutraliser ces solutions, Tillmann, Hirsh et Stoppel ont indiqué l'emploi de la touche au tournesol. Pour notre part, nous avons préféré employer le bleu de

bromothymol en solution sodique à 0 gr. 40 pour cent (1), dont le virage est plus net et s'effectue dans la zone cherchée, c'est-à-dire entre les pH 6,0 et 7,6. Nous avons préparé avec cette solution des papiers réactifs, et nous avons choisi comme terme exact de la neutralité le moment où une addition d'alcali provoque sur ces papiers une coloration franchement bleue. Il suffit d'ailleurs d'un peu d'habitude pour obtenir rapidement la neutralité.

Stabilité de la teinte des solutions nitrées et neutralisées.

La stabilité de la teinte des solutions de matières albuminoïdes nitrées selon la technique indiquée pour la tyrosine et le tryptophane paraît suffisante, si l'on en juge d'après les essais suivants effectués sur la tyrosine, avant même que notre méthode ne soit au point :

Comparaison effectuée au bout de	Solution de m. nitrophénol à 10 mg. pour 100 cc. Hauteurs en centimètres	Solution de tyrosine à 25 mg. pour 100 cc. d'acide azoti- tique 0,1N, additionnée de 0 g. 85 de Na_2O . Hau- teurs en centimètres pour égalité de teintes.
20 minutes	4	1,5 - 1,5 - 1,4
60 minutes	4	1,6 - 1,4 - 1,4
6 jours	4	1,7 - 1,6 - 1,7

Nous avons opéré de même avec le tryptophane.

(1) 0 gr. 10 de bleu de bromothymol dissous au mortier dans 4 cc. 3 de NaOH N/20 et complétés à 25 cc. avec de l'eau distillée (Clark [2]).

Comparaison effectuée au bout de	Solution de tryptophane à 25 mg. pour 100 cc. de NO ₃ H 0,1N additionnée de 2 mg. 5 de nitrite de sodium Hauteurs en centimètres	Solution de m. nitro-phénol à 10 mg. pour 100 cc. Hauteurs en centimètres pour égalité des teintes
24 heures	5	2,5 - 2,7 - 2,5
7 jours	5	2,0 - 2,3 - 2,2 - 2,4 - 2,4

5. - Variation de la coloration en fonction du pH

Une fois le traitement nitrique et la neutralisation effectués, nous nous sommes proposés, selon la technique établie par Tillmann et ses collaborateurs, de faire varier le pH des solutions, par addition de solutions tampons déterminées. Nous avons cherché à obtenir les pH suivants :

1,8 - 2,5 - 4,0 - 6,0 - 7,0 - 8,6 - 11,5 - 12,9

Comme les auteurs nous avons employé pour :

le pH 1,8, HCl 0,1N.

le pH 2,5, HCl 0,1N.

le pH 4,0, de l'acide acétique 0,164M additionné d'acétate de soude à 0,036M.

le pH 6,0, le tampon de Sörensen correspondant :
87^{cc}5 de PO⁴KH² 0,15M + 12^{cc}5 de PO⁴Na²H
0,15M.

le pH 8,6, le tampon de Sörensen correspondant :
1^{cc} de PO⁴KH² 0,15M + 99^{cc} de PO⁴Na²H 0,15M

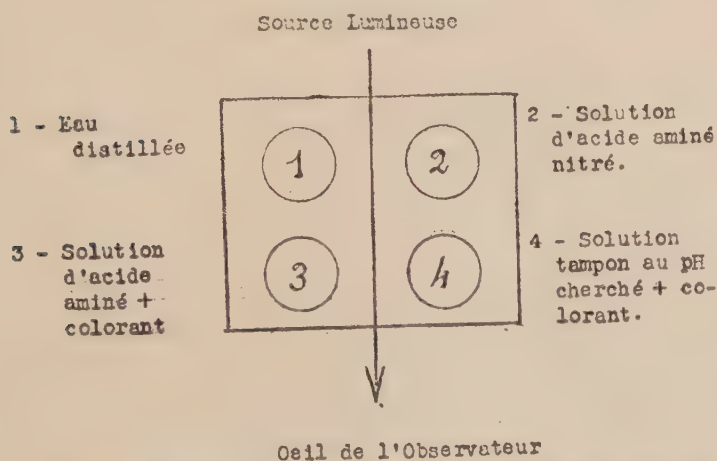
le pH 11,5 }
et le pH 12,9 } de la soude à concentration déterminée.

Les proportions exactes de ces solutions tampons employées sont les suivantes :

- pour le pH1,8 : 40 cc. de solution neutralisée + 10 cc. HCl 0,1N.
- pour le pH2,5 : 49 cc. de solution neutralisée + 1 cc. HCl 0,1N.
- pour le pH4,0 : 40 cc. de solution neutralisée + 10 cc. solution tampon à pH4,0.
- pour le pH6,0 : 40 cc. de solution neutralisée + 10 cc. solution tampon à pH6,0.
- pour le pH8,6 : 40 cc. de solution neutralisée + 10 cc. solution tampon à pH8,6.
- pour le pH11,5 : 10 cc. de solution neutralisée + 3 cc. 3 NaOH 0,1N + $\text{H}_2\text{OQ.S.}$ pour 100 cc.
- pour le pH12,9 : 1 cc. de solution neutralisée + 8 cc. de NaOH 0,1N + 0 cc. 5. H_2O .

Nous avons tenu à nous assurer que les mélanges effectués dans ces conditions amenaient bien nos solutions aux pH cherchés

Pour cela, nous avons employé des solutions tampons et des colorants appropriés que nous avons comparés, à l'aide d'un petit comparateur, à la solution d'acide aminé dont nous voulions vérifier le pH.



Nous donnons ci-dessus le schéma d'un comparateur,

représenté avec ses quatre tubes de verre de même diamètre .

Lorsque le pH de la liqueur à vérifier est le même que celui de la liqueur artificielle, les colorations que l'œil perçoit sont les mêmes.

Nous avons vérifié en particulier les pH 1,8 et 8,6; nous verrons par la suite pourquoi nous avons choisi ces deux pH.

Pour le pH 1,8, nous avons préparé la solution tampon suivante indiquée par Clark :

50^{cc} de KCl 0,2 M + 26^{cc},3 de HCl 0,2 M + H²OQ.S. p. 200^{cc}

Nous en avons placé 5 cc. dans le tube 4. Dans le tube 3 nous avons placé 5 cc. de solution d'acide aminé nitré, ainsi que dans le tube 2. Enfin dans les tubes 3 et 4 nous avons ajouté 2 gouttes d'une solution de bleu de thymol.

Pour le pH 8,6, nous avons employé les tampons de Sörensen en glyocolle. Nous sommes partis d'une solution de glyocolle 0,1 M préparée de la façon suivante :

Glyocolle	1 gr. 50
Na Cl	1 gr. 17
Eau distillée Q. S. pour.....	200 cc.

Nous en avons mélangé à de la soude dans les proportions suivantes :

9^{cc},5 de solution de glyocolle + 0^{cc},5 Na OH 0,1 N.

Nous avons utilisé le comparateur de la même façon que pour le pH 1,8.

Ayant ainsi vérifié nos pH, nous avons cherché à établir pour la tyrosine et le tryptophane la liste des poids de méthanitrophénol pur donnant la même intensité de

coloration que 1 milligramme de tyrosine ou de tryptophane nitrés amenés à ces divers pH.

Pour cela, nous avons opéré de la façon suivante :
Exemple de tyrosine amenée après nitration au pH 1,8 :

Nous avons dissous 25 milligrammes de tyrosine dans 100 cc. d'acide nitrique décinormal additionnés de 0 gr. 20 de nitrite de soude. Nous avons porté la liqueur au bain-marie bouillant pendant 45 minutes. Nous avons ensuite laissé refroidir, nous avons neutralisé à la touche au bleu de bromothymol et nous avons dilué à 500 cc.

Nous avons prélevé 40 cc. de cette liqueur que nous avons additionnés de 10 cc. d'HCl 0,1 N. Nous obtenons un volume total de 50 cc. Nous avons comparé, au colorimètre de Moreau, la coloration obtenue à la solution de métanitrophénol diluée au dixième, et nous avons obtenu les chiffres suivants :

Hauteurs en centimètres	
Tyrosine tamponnée.	m. nitrophénol au dixième
9	6,0 - 6,4 - 6,0 - 6,0 - moyenne : 6,1

Or, dans les 50 cc. de mélange tamponné, il entre 40 cc. de solution de tyrosine. Ces 40 cc. contiennent 2 milligr. de tyrosine. Il s'en suit que 9 cc. du mélange tamponné contiennent 0 mgr. 36 de tyrosine, auxquels correspondent, on vient de le voir, 6 cc. 1 de solution de m. nitrophénol au dixième, contenant 0 mgr. 061 de m. nitrophénol pur.

On en conclut donc que 1 milligramme de tyrosine correspond à : $\frac{0,061}{0,36} = 0 \text{ mgr. } 16$ de m. nitrophénol.

Nous avons répété cet essai sur du tryptophane ainsi que sur de la tyrosine aux autres pH. Nous avons pu calculer des poids de m. nitrophénol correspondants que nous avons réunis dans le tableau ci-dessous :

Poids exprimés en milligrammes de m. nitrophénol correspondant à 1 milligramme de :

pH	Tyrosine	Tryptophane
—	—	—
1,8	0,16	0,14
2,5	0,42	0,24
4,0	0,87	0,26
6,0	2,12	0,51
7,0	2,75	0,98
8,6	4,75	1,46
11,5	3,61	3,00
12,9	3,63	3,27

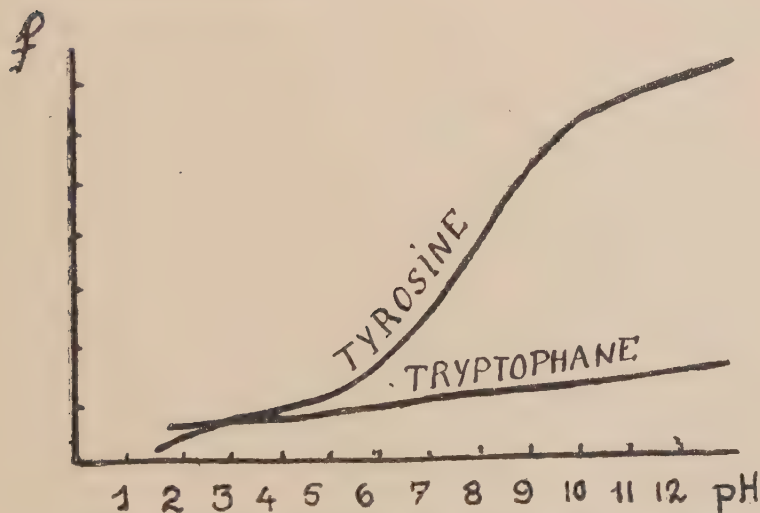
Ces chiffres représentent ce que Tillmann et ses collaborateurs appellent la « valeur en couleur » f de la tyrosine et du tryptophane aux divers pH.

Nous donnons ci-dessous la liste des valeurs en couleur établies par les auteurs :

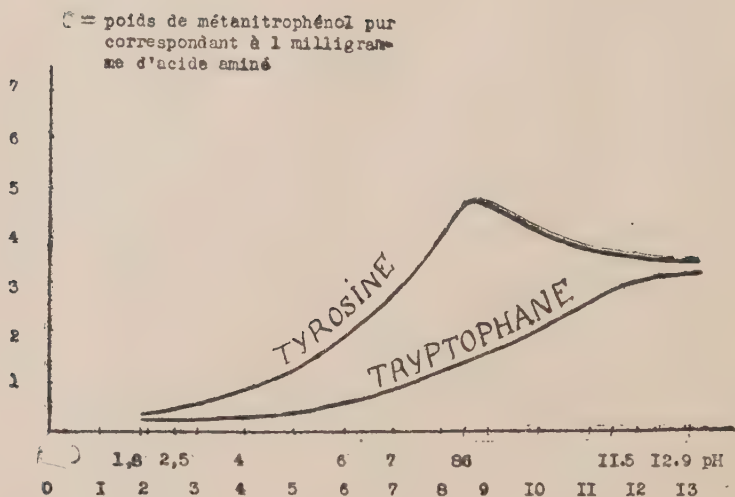
pH	f Tyrosine	f Tryptophane
—	—	—
1,8	0,10	0,40
2,1	0,20	0,41
2,5	0,35	0,43
3,2	0,50	0,50
4,0	0,63	0,60
5,0	0,88	0,64

pH	f Tyrosine	f Tryptophane
6,0	1,5	0,70
7,0	2,5	0,85
8,4	4,2	0,95
9,5	6,2	1,10
10,0	6,5	1,20
11,5	7,0	1,23
12,9	7,4	1,30

Nous avons pu à l'aide de ces résultats établir deux courbes en fonction du pH et du poids de m. nitrophénol pur relatif à chaque acide aminé. Ces courbes permettent d'apprécier les accroissements de coloration de la tyrosine et du tryptophane nitrés au fur et à mesure que l'alcalinité des solutions augmente.



Nous donnons ci-dessous les courbes qu'ont publiés Tillmann, Hirsh et Stoppel.



On peut constater que dans notre dessin la courbe relative à la tyrosine, après avoir été très voisine de celle du tryptophane, s'élève bien plus rapidement que cette dernière, chose qui d'ailleurs était prévue.

Les courbes, que les auteurs ont obtenues par le même procédé, sans addition de soude, ont une allure qui dans l'ensemble est à peu près la même que celle des nôtres. Notre dessin montre toutefois que pour la tyrosine il y a un maximum pour le pH 8,6 et qu'ensuite les deux courbes semblent se rapprocher, ce qui ne se retrouve pas dans les dessins de Tillmann, Hirsh et Stoppel. Cette divergence tient peut-être à ce que nos conditions expérimentales diffèrent de celles qu'emploient Tillmann et ses collaborateurs, qui contrairement à nous n'utilisent pas le nitrite de sodium.

Les chiffres obtenus nous permettent d'effectuer le dosage de la tyrosine et du tryptophane dans les protéines.

Nous suivons pour cela la méthode décrite par Tillmann, Hirsh et Stoppel.

Les points de la courbe entre lesquels la tyrosine offre le maximum de variation d'intensité de coloration sont ceux qui correspondent aux pH 1,8 et 8,6. Nous pouvons donc porter nos solutions d'albuminoïdes nitrées et neutralisées à ces deux pH. Les intensités respectives de coloration étant représentées par leur poids de m. nitrophénol correspondants, soit $S_{1,8}$ et $S_{8,6}$, nous devons pouvoir écrire les équations suivantes :

$$a_{1,8} x + b_{1,8} y = S_{1,8}$$

$$a_{8,6} x + b_{8,6} y = S_{8,6}$$

x étant le poids de tryptophane en milligrammes et y étant le poids de tyrosine en milligrammes, contenus dans la prise d'essai.

$a_{1,8}$ et $a_{8,6}$ étant les poids de m. nitrophénol représentant l'intensité de coloration de 1 milligramme de tryptophane aux pH 1,8 et 8,6.

$b_{1,8}$ et $b_{8,6}$ étant les poids de m. nitrophénol représentant l'intensité de coloration de 1 milligramme de tyrosine aux pH 1,8 et 8,6.

En résolvant ce système d'équations, nous devons avoir pour la quantité de tryptophane contenue dans la prise d'essai :

$$(1) \quad x = \frac{S_{1,8} - b_{1,8} y}{a_{1,8}}$$

et pour la tyrosine :

$$(2) \quad y = \frac{a_{1,8} S_{8,6} - a_{8,6} S_{1,8}}{a_{1,8} b_{8,6} - a_{8,6} b_{1,8}}$$

Application au dosage d'un mélange de tyrosine et de tryptophane

Exemple de dosage :

Nous avons opéré sur un mélange de 7 milligr. de tyrosine et de 1 milligr. de tryptophane. Nous avons nitré et neutralisé pour arriver à un volume final de 160 cc.

Nous avons amené une partie de la solution au pH 1,8 en opérant le mélange suivant :

40 cc. de solution neutralisée
10 cc. d'HCl 0,1 N

Nous avons obtenu un volume total de 50 cc. Nous avons comparé au colorimètre avec une solution de m. nitrophénol diluée au dixième, nous avons fait les lectures suivantes :

HAUTEURS EN CENTIMÈTRES (colorimètre de Moreau)	
Solution tamponnée 9	m. nitrophénol 5,6 - 5,3 - 5,5 - 5,6 - moyenne : 5,5

Ces 5 cc. 5 de solution tamponnée correspondent à 0 mgr. 055 de m. nitrophénol pur. Or, 9 cc. de solution tamponnée correspondent à :

$$\frac{40 \times 9}{50} = 7 \text{ cc. 2 de solution neutralisée.}$$

On peut donc écrire que le poids de m. nitrophénol correspondant à l'intensité de coloration de 1 cc. de solution neutralisée est de :

$$\frac{0,055}{7,2} = 0,0076$$

Nous avons opéré de même pour le pH 8,6. Nous avons effectué le mélange suivant :

10 cc. de solution tampon de Sörensen à pH 8,6

40 cc. de solution neutralisée.

Nous avons comparé au colorimètre, et avons fait les lectures suivantes :

HAUTEURS EN CENTIMÈTRES	
Solution tamponnée 5,	Solution pure de m. nitrophénol 8,2 - 8,4 - 8,1 - 8,7 - moyenne : 8,1

Ces 8 cc. 1 contiennent 0 mg. 81 de m. nitrophénol pur. Or, les 5 cc. de solution tamponnée correspondent à 4 cc. de solution neutralisée. On peut donc écrire pour 1 cc. de solution neutralisée :

$$\frac{0,81}{4} = 0,203$$

Nous avons alors porté ces deux valeurs : $0,0076 = S_{1,8}$ et $0,203 = S_{8,6}$ dans les équations (1) et (2), qui peuvent s'écrire de la façon suivante :

$$y = \frac{(0,14 \times 0,203) - (1,46 \times 0,0076)}{(0,14 \times 4,75) - (1,46 \times 0,16)} = 0,0401 \text{ p. } 1^{\text{cc}}$$

$$x = \frac{0,0076 - (0,16 \times 0,0401)}{0,14} = 0,00845 \text{ p. } 1^{\text{cc}}$$

Or, comme nous avons 160 cc. de solution neutralisée, les quantités de tyrosine et de tryptophane contenues dans la solution sont les suivantes :

$$x = 0,00845 \times 160 = 1 \text{ mgr. } 35 \text{ de tryptophane.}$$

$$y = 0,0401 \times 160 = 6 \text{ mgr. } 41 \text{ de tyrosine.}$$

Les quantités de ces deux acides aminés que nous avons mises en solution étaient de 1 mgr. de tryptophane et de 7 mgr. de tyrosine.

Nous avons ensuite réalisé des concentrations différentes de tyrosine et de tryptophane et nous avons obtenu les résultats suivants :

	Quantités		Quantités		Quantités	
	introduites	trouvées	introduites	trouvées	introduites	trouvées
Tyrosine en mg.	1,0	0,72	5,0	4,93	2,5	2,02
Tryptophane —	7,0	7,74	2,5	2,92	5,0	5,71

On voit que la méthode ne paraît pas susceptible d'une bonne précision. Il est d'ailleurs facile de se rendre compte que le moindre changement dans l'appréciation de la teinte retentit d'une façon considérable sur les résultats. En effet, si nous reprenons les calculs en sens inverse, nous constatons que nous aurions dû obtenir pour le pH 1,8 une hauteur, au colorimètre, égale à 5 cc. 13 au lieu de 5 cc. 47 et pour le pH 8,6 une hauteur de 3 cc. 74 au lieu de 3 cc. 71. Ces différences de hauteur sont, on le voit, très minimes et cela prouve malgré tout que l'on

peut se contenter de cette méthode si on ne lui demande pas plus de précision qu'elle ne peut en fournir.

Application à diverses matières protéiques :

Nous indiquerons tout d'abord qu'il n'y a pas de procédé uniforme de dissolution des matières protéiques. Tillmann et ses collaborateurs conseillent de dissoudre chaque substance albuminoïde dans de l'acide azotique décinormal. Nous avons constaté que dans bien des cas il nous était impossible d'obtenir des dissolutions complètes et claires permettant de bonnes lectures au colorimètre, en n'employant que de l'acide nitrique décinormal. Souvent il nous a fallu recourir à de courtes digestions à la soude ou à l'emploi d'acide acétique. Cela ne nous a d'ailleurs pas empêché d'obtenir par la suite de bonnes nitrations avec $\text{No}^3 \text{H } 0,1 \text{ N}$.

Nous avons donc appliqué les méthodes des auteurs de la façon suivante :

Opérer la dissolution de 25 milligrammes de matière protéique. A la liqueur obtenue et neutralisée, ajouter 100 cc. de $\text{No}^3 \text{H } 0,1 \text{ N}$ additionnés de 0 gr. 20 de nitrite de sodium. Porter 45 minutes au bain-marie bouillant. Laisser refroidir et mesurer le volume de la liqueur. En prélever une quantité aliquote et l'amener au pH 1,8. Pour cela utiliser le comparateur. Verser dans le tube 3 (voir page 73) la liqueur à titrer additionnée de 2 gouttes d'une solution de bleu de thymol, dans le tube 4 introduire la même quantité de solution tampon à pH 1,8 additionnée

de 2 gouttes de bleu de thymol. Dans le tube 2 introduire le même volume de liqueur à titrer, mais sans colorant. Verser peu à peu dans le tube 3 de l'HCl 0,1 N, ainsi que dans le tube 2, jusqu'à ce que les colorations obtenues de part et d'autre soient identiques. Noter le volume d'acide chlorhydrique décinormal ajouté. Mettre cette même quantité d'H Cl 0,1 N avec le même volume de la liqueur à titrer, afin que cette dernière soit ainsi au pH 1,8.

Opérer de la même façon avec de la soude 0,1 N pour le pH 8,6 en utilisant alors une solution tampon à pH 8,6 et comme colorant du bleu de bromothymol.

Comparer ensuite les deux liqueurs amenées à leur pH respectif avec une solution de m. nitrophénol pure ou diluée au dixième. En déduire pour chaque pH la quantité de m. nitrophénol correspondant à 1 cc. de solution pure nitrique neutralisée, soit $S_{1,8}$ et $S_{8,6}$.

On obtiendra les quantités de tyrosine et de tryptophane exprimées en milligrammes contenues dans 1 cc. de liqueur nitrique en portant les valeurs $S_{1,8}$ et $S_{8,6}$ dans les équations suivantes :

$$x \text{ (tryptophane)} = \frac{S_{1,8} - 0,16 y}{0,14}$$

$$y \text{ (tyrosine)} = \frac{0,14 S_{8,6} - 1,46 S_{1,8}}{(0,14 \times 4,75) - (1,46 \times 0,16)}$$

Rapporter ensuite les valeurs obtenues à 100 milligrammes de matière protéique.

Résultats obtenus :

Nous donnons ci-dessous les résultats que nous avons obtenus en appliquant cette technique à diverses matières albuminoïdes. Dans plusieurs cas (albumine de l'œuf, gélatine, fibrine) nous avons dû calculer l'azote total de ces substances pour obtenir le pourcentage d'albumine vraie qu'elles contenaient. Pour cela nous avons multiplié ce chiffre d'azote total par 6,25, qui est un coefficient moyen applicable à la plupart des matières albuminoïdes.

Nous avons réuni nos résultats dans le tableau suivant :

	Méthode de dissolution	Tyrosine pour cent	Tryptophane pour cent
Albumine d'œuf...	22 mg. 3 d'albumine vraie + NaOH à 5 % : 10 cc.	1,66	9,10
Gélatine	Gélatine 1 gr. + acide acétique : 30 cc.	0,16	0,90
Edestine	Edestine 250 mgr. + NaOH à 5 % : 25 cc.	3,55	3,71
Fibrine	Fibrine 400 mg. + NaOH à 25 % : 70 cc.	5,9	Chiffre négatif
Caséine	Caséine 250 mg. + acide acétique : 50 cc.	7,71	0,09

On peut constater que, parmi tous ces résultats, quelques-uns sont très éloignés de ceux que donne, par

exemple, la réaction de Millon-Zuwerkalow. L'on ne s'attendait pas au premier abord à ce que les équations de Tillmann, Hirsh et Stoppel nous conduisent à des chiffres négatifs comme nous l'avons constaté pour la fibrine. Ces chiffres négatifs qui, tout d'abord, nous ont surpris, nous ont amenés à étudier dans quels cas les deux équations, qui doivent être résolues au cours des calculs, pouvaient nous donner des résultats de cet ordre.

Il était possible de prévoir que la réaction xantho-protéique donnerait dans certains cas des résultats négatifs. En effet ces deux équations peuvent s'écrire sous la forme suivante :

$$a \text{ Ty} + b \text{ Tr} = S \text{ à pH } 1,8$$

$$a' \text{ Ty} + b' \text{ Tr} = S' \text{ à pH } 8,6$$

dans lesquelles a et a' représentent les poids de m. nitro-phénol pur correspondant à 1 mgr. de Tyrosine et b et b' les poids de m. nitrophénol pur correspondant à 1 mgr. de Tryptophane. Ty et Tr étant les poids de Tyrosine et de Tryptophane contenus dans la prise d'essai.

Supposons que $\text{Ty} = 0$, dans ce cas on a :

$$b \text{ Tr} = S$$

$$\text{et } b' \text{ Tr} = S', \text{ d'où}$$

$$\frac{S'}{S} = \frac{b'}{b} = \frac{1,46}{0,14} = 10,4$$

Si au contraire $\text{Tr} = 0$, on a :

$$a \text{ Ty} = S$$

$$\text{et } a' \text{ Ty} = S' \text{ d'où}$$

$$\frac{S'}{S} = \frac{a'}{a} = \frac{4,75}{0,16} = 29,6$$

On en conclut donc que moins la substance albuminoïde contiendra de tyrosine, plus le rapport tendra vers le minimum 10,4, et que moins elle contiendra de tryptophane plus le rapport tendra vers le maximum 29,6. Autrement dit la variation du maximum d'intensité de coloration en fonction des pH est forcément comprise entre deux limites extrêmes, l'une inférieure, c'est-à-dire 10,4, dans le cas où le milieu ne contient que du tryptophane, et l'autre supérieure, soit 29,6 dans le cas où il n'y a que de la tyrosine. En dehors de cet intervalle nous devons trouver des chiffres négatifs pour la tyrosine si le rapport est inférieur à 10,4 et pour le tryptophane si le rapport est plus grand que 29,6.

Nous avons établi ce rapport pour un certain nombre de matières protéiques. Nous avons obtenu les chiffres suivants :

Edestine	20,5
Gélatine	13,7
Albumine d'œuf	13,7
Caséine	29,9 et 21,8
Fibrine	40

La variation de l'intensité de coloration en fonction du pH est donc trop forte dans certains cas. Il faut donc admettre soit que la coloration obtenue en milieu acide est trop faible, soit que celle produite à pH 8,6 est trop forte, soit que ces deux causes se produisent simultanément. Comme les essais obtenus avec le mélange des acides aminés sont satisfaisants, on en vient donc à incriminer le milieu dans lequel on opère (hydrolyse incom-

plète changeant la valeur en couleur déterminée pour les acides aminés purs — action empêchante des substances voisines — action de corps donnant une réaction xanthoprotéique avec une valeur de rapport plus forte, etc...).

Malgré cet échec qui ne nous a pas permis de retrouver les résultats satisfaisants annoncés par les auteurs, nous avons continué cette étude dans l'espoir, d'ailleurs déçu, de trouver au cours de comparaisons avec d'autres méthodes la raison de nos insuccès.

ESSAIS D'ADAPTATION DE LA MÉTHODE DE TILLMANN, HIRSH ET STOPPEL DE FAÇON A PERMETTRE L'EMPLOI SIMULTANÉ D'AUTRES MÉTHODES

1. - Emploi simultané de la réaction xanthoprotéique et de la réaction de Zuwerkalow rendant possible l'utilisation du colorimètre de Duboscq.

Pour permettre une comparaison plus précise de la réaction xanthoprotéique ainsi établie, nous nous sommes demandés si l'on ne pourrait pas associer les réactions de Millon-Zuwerkalow et xanthoprotéique, en opérant pour toutes les deux sur des solutions acétiques. Nous avons donc opéré des dissolutions acétiques à des concentrations telles qu'elles puissent être utilisées aussi bien pour la réaction de Millon que pour la réaction xanthoprotéique.

Puis nous avons cherché à nous rendre compte si l'acide acétique ne nuisait pas à la réaction.

Nous avons préparé pour le tryptophane le mélange suivant :

Tryptophane	5 mgr.
Acide acétique	20 cc.
Acide azotique 0,1 N	20 cc.
Nitrite de soude	0 gr. 04.

que nous avons porté comme d'habitude au bain-marie bouillant. La présence d'acide acétique nous plaçant très près du pH 1,8, nous nous sommes bornés à établir ce pH pour vérifier l'intensité de coloration de 1 mgr. de tryptophane.

Nous avons obtenu le chiffre 0,165, alors qu'en réalité nous aurions dû obtenir 0,14.

Pour la tyrosine, nous avons opéré la réaction sur le mélange suivant :

Tyrosine	25 mgr.
Acide acétique	100 cc.
Acide azotique 0,1 N	100 cc.
Nitrite de soude	0 gr 20.

Comme intensité de coloration pour 1 mgr. de tyrosine, nous avons obtenu 0,16, chiffre exact que nous avons déjà pu établir précédemment.

On peut donc dire que la présence d'acide acétique ne gêne pas sensiblement la réaction ; cependant elle la complique considérablement, en particulier pour l'établissement du pH 8,6. Pour le pH 1,8 rien n'est plus simple,

car une fois la nitrification faite, la liqueur se trouve la plupart du temps au voisinage du pH 1,8. Mais pour arriver au pH 8,6, comme on doit neutraliser à la soude, on se trouve en présence du mélange tampon acide acétique — acétate soude, qui met dans l'impossibilité d'utiliser les tampons courants pour le pH 8,6. Il faut d'autre part employer des volumes considérables de solution de soude.

Il y a donc nécessité d'opérer d'une façon empirique, de neutraliser la liqueur à la lessive de soude pure, puis de l'alcaliniser peu à peu jusqu'au pH 8,6 en la comparant à une solution étalon à pH 8,6 en présence de bleu de bromothymol. Cette méthode est d'ailleurs celle que nous avons préconisée dans la technique que nous avons exposée plus haut. Il nous est fréquemment arrivé en effet d'avoir à faire à des dissolutions de matières protéiques faites dans de la soude ou de l'acide acétique et nous avons dû constamment vérifier le pH de cette sorte.

Nous nous sommes ensuite demandés si nous ne pourrions pas augmenter les concentrations des matières protéiques de façon à avoir des intensités de coloration beaucoup plus fortes et à pouvoir employer comme pour la réaction de Millon le colorimètre de Duboscq à la place du colorimètre de Moreau.

Nous avons essayé les concentrations suivantes :

Tyrosine ou Tryptophane	20 mgr.
Acide acétique	20 cc.
Acide azotique 0,1 N	20 cc.
Nitrite de soude	0 gr. 16.

en faisant varier les quantités relatives d'acide azotique et de nitrite de soude.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

Intensités de coloration exprimées en milligrammes de m. nitrophénol				
	Normales	NO ³ H 0,1N : 20 cc. NO ² Na : 0 gr. 16	NO ³ H 0,1N : 40 cc. NO ² Na : 0 gr. 16	NO ³ H 0,1N : 20 cc. NO ² Na : 0 gr. 32
Tyrosine :				
pH 1,8	0,16	0,12	0,09	0,16
pH 8,6	4,75			4,73
Tryptophane :				
pH 1,8	0,14	0,10		0,15
pH 8,6	1,46			1,40
pH 7,0	0,98			0,98

En opérant donc dans les conditions du troisième essai, on peut se permettre d'augmenter la concentration en matière protéique et il est possible dans ce cas d'utiliser le colorimètre de Duboscq.

2. - Adaptation de la réaction xanthoprotéique au dosage séparé de la tyrosine et du tryptophane au moyen du sulfate mercurique.

Nous avons songé qu'il serait peut-être possible d'utiliser dans la méthode xanthoprotéique la précipitation du tryptophane au moyen du sulfate mercurique préconisée par Folin et Marenzi dans leur méthode au réactif phosphomolybdotungstique. En effet, la tyrosine et le tryptophane une fois séparés ne pourraient-ils pas subir la réaction xanthoprotéique ?

Il convenait donc de s'assurer que la présence de sulfate mercurique n'entravait pas la réaction.

Notre idée primitive était d'incorporer au dosage de Folin et Marenzi un dosage basé sur la réaction xantho-protéique. Nous avons donc voulu placer nos acides aminés (tyrosine et tryptophane) exactement dans les mêmes conditions où ils se trouvent dans la méthode de Folin et Marenzi. De plus, pour être sûrs que, même lorsqu'il se trouvera en grand excès le sulfate mercurique n'entravera pas la réaction, nous avons placé nos acides aminés en contact avec un excès de sulfate mercurique.

Pour le tryptophane, nous avons donc opéré sur les quantités suivantes :

Tryptophane	2 mgr.
Sulfate mercurique pur	60 mgr.
Acide chlorhydrique 0,1 N	10 cc.

Après dissolution, nous avons placé la liqueur au bain-marie bouillant pendant 30 minutes. Nous avons filtré sur un petit filtre, bien qu'il n'y ait aucun résidu apparent, puis nous avons complété à 30 cc. avec de l'acide azotique décinormal accompagné de 0 gr. 10 de nitrite de soude. Nous avons porté au bain-marie bouillant pendant 45 minutes. Après refroidissement nous avons complété le volume à 30 cc.

Nous avons ensuite porté la liqueur au pH 1,8 et 8,6. Or, à partir du pH 7,0, l'addition de soude provoque un précipité abondant d'oxyde de mercure. Nous avons pensé éviter ce précipité en additionnant la liqueur xantho-protéique refroidie de 2 cc. d'une solution de cyanure de

sodium à 5 %. Nous n'avons constaté en effet par la suite aucun précipité à la neutralisation.

Nous nous sommes ensuite placés aux pH 1,8 et 8,6 et nous avons constaté que les intensités de coloration de 1 mgr. de tryptophane étaient bien ainsi les mêmes que celles que nous avions calculées :

En effet au pH 1,8, $f = 0,133$ au lieu de 0,14 précédemment trouvé.

Au pH 8,6, $f = 1,458$ au lieu de 1,46 précédemment trouvé.

Pour le tryptophane donc il n'y a aucun inconvénient à le doser en présence de sulfate mercurique.

Pour la tyrosine au contraire, il n'en est plus de même. La réaction serait en effet possible si nous étions dans les mêmes conditions que pour le tryptophane. Mais après la séparation de ce dernier, la tyrosine se trouve accompagnée de sulfate mercurique en solution dans de l'acide sulfurique sensiblement 2 N ; ce qui fait que lorsque nous nous disposions à opérer la réaction xanthoprotéique, c'est une réaction de Millon qui se développait immédiatement dès que nous ajoutons le nitrite de soude.

On peut cependant tourner cette difficulté et incorporer au dosage de Folin et Marenzi deux dosages séparés de la tyrosine et du tryptophane au moyen de la réaction xanthoprotéique.

En effet, avant d'opérer la séparation de ces deux corps dans la substance protéique considérée, il suffit de pratiquer une réaction xanthoprotéique, et en nous plaçant au pH qui nous donnera le maximum d'intensité de teinte et la lecture au colorimètre la plus facile, c'est-à-dire au

pH 8,6, nous obtiendrons une première valeur de l'intensité de coloration F, donnée à la fois par la tyrosine et le tryptophane. Quand nous aurons séparé ce dernier, nous pourrons établir pour lui une autre valeur de l'intensité de coloration f, valeur qui lui sera particulière.

Il sera alors facile de calculer F-f, qui représentera la valeur de l'intensité de coloration de la tyrosine. Nous déduirons la quantité de tyrosine contenue dans la prise d'essai ainsi qu'il suit :

$$x = \frac{F-f}{4,75} \text{ milligrammes de tyrosine.}$$

et la quantité de tryptophane de la façon suivante :

$$y = \frac{f}{1,46} \text{ milligrammes de tryptophane}$$

Nous avons utilisé cette méthode pour diverses matières protéiques ; voici les résultats que nous avons obtenus :

	Albumine d'œuf	Gélatine	Edestine de Chênevis	Caséine	Fibrine desséchée
Tyrosine pour cent	3,84	0	4,03	5,77	4,06
	3,94	0	4,17	5,75	4,77
	3,70	0		5,71	4,93
Tryptophane pour cent	1,98	0	1,76	1,42	1,27
	1,86	0	1,67	1,19	1,43
	1,92	0		1,30	1,49

Les résultats obtenus pour le tryptophane sont commentés au chapitre IV.

Quant à ceux fournis par le dosage de la tyrosine par différence, tel qu'il est indiqué dans les pages précédentes, ils sont trop différents de ceux des autres méthodes pour qu'il y ait intérêt à les comparer. Ces résultats très aberrants sont probablement dus en grande partie à la méthode *par différence* utilisée.

CHAPITRE IV

ÉTUDE DE LA MÉTHODE DE FOLIN ET MARENZI POUR LE DOSAGE DE LA TYROSINE ET DU TRYPTOPHANE DANS LES MATIÈRES PROTÉIQUES

Essais de modification

Rappelons le principe de cette méthode dont nous avons exposé plus haut l'historique : on commence par hydrolyser la substance protéique, puis on sépare la tyrosine du tryptophane, en précipitant ce dernier par addition de sulfate mercurique. On dose la tyrosine par une réaction de Millon semblable à celle que nous venons d'étudier plus haut, et le tryptophane par le réactif des phénols de Folin et Ciocalteu [5].

Description de la méthode :

1° Hydrolyse de la substance protéique.

Dans un tube pyrex de 150 $\frac{m}{m}$ sur 16 $\frac{m}{m}$ introduire un poids d'albuminoïde voisin de 100 mgr. exactement

pesé, avec 2 cc. de soude à 20 % de Na OH pure. Chauffer légèrement pour dissoudre et fermer le tube au moyen d'un bouchon de liège, recouvert d'un papier d'étain et surmonté d'un tube de 50 $\frac{c}{m}$ formant condensateur. Laissez au bain-marie bouillant de 12 à 18 heures selon la matière protéique utilisée (pour l'albumine de l'œuf de 12 à 14 heures ; pour la globuline de 14 à 18 heures ; pour la caséine, temps d'hydrolyse beaucoup plus long, on pourrait utiliser avec succès le bain d'huile).

Puis à la solution chaude ajouter 3 cc. de $SO^4 H^2 7 N$ (concentration nécessaire pour précipiter la silice des tubes pyrex qui pourrait rester à l'état colloïdal). Refroidir et transférer dans une fiole jaugée de 25 cc., à l'aide d'une petite quantité d'eau. Compléter à 25 cc. Ajouter de 0 gr. 20 à 0 gr. 50 de kaolin, agiter et filtrer sur un petit filtre de 9 $\frac{c}{m}$ (couvrir l'entonnoir, car la filtration est lente). On recueille 20 cc. de filtrat.

2° Séparation du tryptophane.

On introduit ces 20 cc. de filtrat dans un tube conique de centrifugeur de 50 cc. avec 4 cc. de solution de sulfate mercurique rigoureusement exempt de sulfate mercurieux, faite de 15 gr. de $SO^4 Hg$ pour 85 gr. de $SO^4 H^2 6 N$ et versée goutte à goutte, à une distance du niveau du liquide qui ne sera pas inférieure à 3 $\frac{c}{m}$. Bien agiter et laisser reposer 2 à 3 heures (temps minimum 2 heures). Centrifuger de 5 à 10 minutes. Dans ces conditions d'acidité, le tryptophane est précipité en n'entraînant qu'une faible quantité de tyrosine et aussi toute la cystine.

Décantier dans une fiole jaugée de 100 cc. et laver les bords du tube avec 1 cc. de $\text{SO}^4 \text{H}^2 \text{N}/10$. Verser dans le tube 10 cc. de solution de $\text{SO}^4 \text{Hg}$ à 1,5 % dans $\text{SO}^4 \text{H}^2$ 2 N et mettre le précipité en suspension à l'aide d'un agitateur que l'on rince ensuite avec 2 cc. de la même solution. Laisser reposer 10 minutes puis, centrifuger à nouveau. Verser la liqueur surnageante dans la fiole de 100 cc. Pour terminer la séparation, faire un lavage identique avec 10 cc. de $\text{SO}^4 \text{H}^2 \text{N}/10$ et rincer les bords du tube avec 1 cc. de $\text{SO}^4 \text{H}^2 \text{N}/10$.

3° Dosage de la Tyrosine.

La liqueur contenue dans la fiole de 100 cc. qui renferme la tyrosine est comparée avec une solution type de tyrosine de même titre en $\text{SO}^4 \text{H}^2$. Pour préparer cette solution type il faut opérer le mélange suivant :

Solution de tyrosine à 1 % dans $\text{SO}^4 \text{H}^2$ 2 N.	4 cc.
Eau	16 cc.
Solution de $\text{SO}^4 \text{Hg}$ à 15 % dans $\text{SO}^4 \text{H}^2$ 6 N.	4 cc.
Solution de $\text{SO}^4 \text{Hg}$ à 1,5 % dans $\text{SO}^4 \text{H}^2$ 2 N. .	12 cc.
$\text{SO}^4 \text{H}^2 \text{N}/10$	14 cc.
$\text{SO}^4 \text{H}^2$ 7 N	6 cc.

Placer ces deux solutions en même temps au bain-marie bouillant pendant 5 minutes. Refroidir et ajouter, dans chaque flacon, 1 cc. de solution de nitrite de soude à 2 % ; après 2 minutes de contact, diluer à 100 cc. et faire la comparaison aussitôt au colorimètre.

Calcul = 4×20 ou 80 divisé par le nombre de

divisions du colorimètre, lorsque la solution type est placée sous 20 $\frac{m}{m}$, donne la proportion de tyrosine en milligr. contenue dans les 20 cc. d'hydrolyse.

Remarque. — Il est essentiel que l'acidité des 2 solutions soit la même, après dilution à 100 cc.

4° Dosage du Tryptophane.

Pour cela, employer l'une des 2 méthodes décrites par Folin et Ciocalteu. Toutefois les auteurs conseillent la méthode suivante qu'ils préfèrent à celle qui utilise l'élimination du mercure par l'hydrogène sulfuré.

Au précipité contenu dans le tube pyrex ajouter 10 cc. d'H Cl N. Placer au bain-marie bouillant pendant trente minutes, opération indispensable pour décomposer le complexe mercure-tryptophane. Il peut arriver qu'une trace de matières insolubles reste dans le tube. Vérifier que ce résidu ne donne aucune coloration avec le réactif des phénols. Refroidir la solution chaude et filtrer dans une fiole jaugée de 100 cc. Laver le filtre jusqu'à obtention d'un volume d'environ 60 cc. Dans une autre fiole de 100 cc., introduire 1 mgr. de tyrosine et diluer à 60 cc.

Dans chaque flacon ajouter 25 cc. de solution saturée de carbonate de soude (qui ne devra pas avoir été en contact avec un bouchon de caoutchouc). Mélanger, ajouter 5 cc. de réactif des phénols de Folin et Ciocalteu Agiter, laisser reposer 5 minutes. Ajouter 2 à 3 cc. de solution de cyanure de sodium à 5 %. Amener à 100 cc. et comparer à la solution type de tyrosine sous 20 $\frac{m}{m}$.

$$\text{Calcul} = \frac{1 \times 20}{H} \times 0,843 \text{ donne en milligrammes}$$

la proportion de tryptophane contenu dans les 20 cc. d'hydrolysate.

Le facteur 0,843 représente l'intensité de coloration développée par le tryptophane si l'on désigne par 1 celle de la tyrosine.

Remarque. — Il est essentiel d'employer, pour la séparation du tryptophane, un sulfate mercurique très pur, exempt de sulfate mercurieux et autres sels susceptibles d'influencer le réactif de Folin. Ce sel pur est obtenu par la méthode de Folin et Ciocalteu.

Préparation du sulfate mercurique pur

Principe. — Contrairement au sulfate mercurique, le sulfate mercurieux est insoluble dans l'acide sulfurique faible. On utilise cette propriété pour éliminer le sel mercurieux. Le sulfate mercurique est alors précipité de sa solution par addition d'acide sulfurique concentré. Cette dernière opération doit être répétée plusieurs fois pour obtenir le sel pur.

Technique. — Introduire dans un cristalliseur pyrex de 4 litres 1.000 gr. de sulfate mercurique et 150 cc. d'acide sulfurique concentré. Agiter jusqu'à obtention d'une pâte homogène. Ajouter alors de l'eau distillée peu à peu en agitant constamment avec une spatule de verre ou de porcelaine, jusqu'à ce que la pâte obtenue précédemment ne

reste plus adhérente au récipient (Il faut employer de 1.700 à 1.800 cc. d'eau pour dissoudre le sulfate mercurique). On obtient alors une suspension plus ou moins grise que l'on jette sur un bon filtre placé au-dessus d'un récipient de 4 litres. La filtration est lente; si on obtient un liquide trouble le repasser à travers le filtre. La coloration du filtrat est due au fer contenu dans le sulfate mercurique primitif.

Ajouter peu à peu, au filtrat, en agitant, 450 cc. d'acide sulfurique concentré. Il se produit un grand dégagement de chaleur; aussi faut-il placer le récipient dans de l'eau froide. Au début, le précipité blanc qui se forme se redissout, puis, au fur et à mesure de l'addition d'acide, se reforme rapidement. Recueillir, par décantation, environ 100 cc. du liquide surnageant et lui ajouter 10 cc. d'acide sulfurique concentré. S'il se produit un précipité abondant, ajouter encore de l'acide sulfurique à la mixture primitive. Cependant 450 cc. auront dû être suffisants. Refroidir et filtrer sur un entonnoir de Büchner à travers un papier-filtre renforcé. Rincer avec 400 cc. d'une solution d'acide sulfurique à 25 volumes pour 100 volumes d'eau et aspirer à la trompe. Chasser le précipité dans un cristalliseur de 4 litres. Ajouter 450 cc. d'acide sulfurique concentré, mélanger de façon à obtenir une pâte homogène et dissoudre comme auparavant par addition graduelle d'eau.

A ce moment la filtration est le plus souvent inutile parce que la solution est complète; cependant si la solution n'est pas absolument claire, la filtrer. Répéter la précipitation par addition d'acide sulfurique comme pour le premier filtrat, refroidir, filtrer et rincer avec une solu-

tion froide d'acide sulfurique (1 volume d'acide pour 3 volumes d'eau). Chasser le précipité dans un cristalliseur sec, au moyen d'une spatule de verre; y ajouter peu à peu et en agitant 500 cc. d'un mélange à parties égales d'alcool et d'éther; mélanger parfaitement et filtrer sur un Büchner. Pour cette dernière filtration, il n'est pas nécessaire d'employer un filtre renforcé. Rincer le cristalliseur avec très peu d'alcool-éther, que l'on verse sur le précipité, mais il importe de ne pas pousser le lavage plus loin. Il suffit, en effet, de très peu d'eau ou d'humidité, pour donner un précipité jaune de sulfate basique, alors que, pratiquement, tout l'acide sulfurique a été ainsi enlevé. Ce précipité ne se produira pas si les instructions sont bien suivies.

Placer le précipité sur une assiette de porcelaine poreuse neuve. Placer cette assiette sur une double couche de papier-filtre, loin de toute atmosphère humide et laisser sécher à la température du laboratoire. Rendement 750 grammes.

Nous avons suivi cette méthode en opérant sur 250 gr. de sulfate mercurique ordinaire Rhône-Poulenc et nous avons obtenu 180 gr. de produit. Ce qui nous donne un rendement de 72 % au lieu de 75 %.

Contrôle de cette technique.

Nous avons d'abord vérifié cette méthode en opérant des précipitations de tryptophane à partir de ses solutions par le sulfate mercurique et en déterminant, d'autre part,

les proportions de tyrosine et de tryptophané contenus dans un mélange des deux.

En premier lieu donc, nous avons opéré sur un poids de tryptophane de 3 milligrammes, auquel nous avons fait subir tous les traitements indiqués par Folin, y compris l'hydrolyse.

La réaction comporte de longues manipulations mais est assez satisfaisante, puisque le dosage colorimétrique au moyen du réactif des phénols, nous avons obtenu un chiffre de tryptophane égal à 2 mg. 50 alors que nous opérons sur 3 mg. En second lieu, nous avons fait un mélange de 8 mg. 5 de tyrosine avec 2 mg. 2 de tryptophane. Les dosages successifs nous ont donné 2 mg. 55 de tryptophane et 8 mg. 44 de tyrosine.

CHAPITRE V

ÉTUDE COMPARATIVE DES DIVERSES MÉTHODES ÉTUDIÉES DANS LES CHAPITRES PRÉCÉDENTS

Les résultats obtenus par la méthode de Folin et Marenzi étaient donc encourageants et nous nous sommes alors proposés d'examiner dans quelle mesure les résultats étaient comparables lorsqu'on introduisait dans cette méthode, en en conservant le cadre, c'est-à-dire, l'hydrolyse alcaline et la séparation du tryptophane par SO^4Hg , les méthodes étudiées précédemment. Autrement dit nous avons essayé d'appliquer à l'hydrolysât en plus des dosages de Folin et Marenzi.

1° Avant la séparation du tryptophane, la méthode de Zuwerkalow [33] étudiée au chapitre I, et celle de Greenberg [11] étudiée au chapitre II.

2° Après séparation du tryptophane, le dosage du tryptophane exclusivement par la méthode de Tillmann, Hirsh et Stoppel [30] telle que nous l'avons mise au point au chapitre III.

Nous n'avons pu, sans grande complication, y ajouter le dosage de la tyrosine par la réaction xanthoprotéique,

car comme dans la solution de la matière protéique on se trouve en présence d'un sel mercurique, il s'opère une réaction de Millon.

Technique utilisée

1° *Hydrolyse.*

La quantité de matière protéique que nous employons est de 200 mg. (concentration double de celle indiquée par la méthode primitive, à cause des nombreux dosages). Nous mettons en dissolution ces 200 mg. dans 2 cc. de soude à 20 % de NaOH pure, dans un tube pyrex bouché et surmonté d'un condensateur, en chauffant légèrement. Nous portons au bain-marie bouillant pendant 14 heures. Nous diluons alors à 10 cc. La liqueur est légèrement trouble.

2° *Détermination de l'indice xanthoprotéique (voir page 83). Technique :*

Nous opérons le mélange suivant dans une fiole conique pyrex :

3 cc. de la sol. précédente, soit 60 mg. de matière protéique.

Acide azotique pur $D = 1,332$ q.s.p. neutraliser.

100 cc. d'acide azotique N/10.

0 gr. 20 de nitrite de soude.

Nous portons au bain-marie bouillant 45 minutes. Le

volume est alors, en général de 102-103 cc. Nous portons au pH 8,6. Nous constatons au comparateur qu'il faut pour cela ajouter à 5 cc. de la solution albuminoïde : 1 cc. 3 de NaOH à 5 %. Nous obtenons donc un volume total de 6 cc. 3. Nous portons au colorimètre de Duboscq. Nous obtenons les résultats suivants :

HAUTEURS EN MILLIMÈTRES

Solution albuminoïde	Sol. de m. nitrophénol pure
H	H'

Calcul :

Comme la solution de métanitrophénol est à 100 mg. pour 1.000 cc., on peut dire que la teneur x , de ces 6 cc. 3 de solution tamponnée exprimée en métanitrophénol pur est donné par le rapport

$$\frac{x}{100} = \frac{H'}{H} \times \frac{6,3}{1000}$$

Or x , exprime la valeur en métanitrophénol de 5 cc. de solution albuminoïde nitrique, donc 102 cc. ont comme valeur :

$\frac{x \times 102}{5}$ ce qui représente la valeur en métanitrophénol de 60 mg. de matière protéique.

Pour 100 mg. on aura donc :

$$\frac{x \times 102 \times 100}{5 \times 60}$$

Or, nous avons établi au chapitre IV que, au pH 8,6, la valeur en m. nitrophénol de 1 mg. de tyrosine est de 4,75. La quantité de tyrosine contenue dans 100 mg. de matière protéique sera donc exprimée par :

$$\frac{x \times 102 \times 100}{5 \times 60 \times 4,75}$$

Il est évident que le chiffre trouvé par ce procédé est arbitraire puisque la valeur en métanitrophénol calculée représente, non seulement la tyrosine, mais aussi le tryptophane, dont la valeur particulière m. nitrophénol n'est que 1,46 par milligramme.

3° *Détermination de l'indice de Millon Zuwerkalow modifié* (voir page 42).

Technique :

Nous opérons le mélange suivant :

Matière protéique sodée : 0 cc. 5, soit 10 mg. d'albumine.

Acide sulfurique 7N pour neutraliser. 0 cc. 27

Acide acétique 2 cc. 73

Sulfate mercurique en solution à 10 %

dans SO^4H^2 à 5 % 2 cc.

Nitrite de soude en solution à 0,5 % . II gouttes

Nous portons au bain-marie bouillant 1 minute. Nous laissons la coloration s'établir pendant 15 minutes et nous comparons au colorimètre avec une solution de tyrosine à 0 mg. 4 par centimètre cube.

Nous obtenons comme résultat :

HAUTEURS EN MILLIMÈTRES

Solution de matière protéique	Solution étalon de tyrosine
H	H'

Calcul : soit x le poids de tyrosine correspondant à 10 mg. de substance protéique, on peut écrire :

$$\frac{x}{0,4} = \frac{H'}{H}$$

$$\text{d'où } x = 0,4 \frac{H'}{H}$$

et pour 100 milligrammes de matières protéiques :

$$x = \frac{4 H'}{H}$$

4° *Détermination de l'indice phénolique de Folin et Greenberg* (voir page 49).

Technique :

Nous opérons le mélange suivant :

- 1 cc. de solution albuminoïde , soit 20 mg.
- 2 cc. de NaOH 5N.
- 3 cc. de réactif de Folin et Ciocalteu.
- Eau distillée q.s.p. 50 cc.

Nous comparons au colorimètre après 2 heures de repos, avec 2 cc. d'une solution de tyrosine à 0 mg. 4 par centicube.

Nous obtenons les résultats suivants :

HAUTEURS EN MILLIMÈTRES

Solution d'albuminoïde	Solution étalon de tyrosine
H	H'

Calcul : soit x le poids de tyrosine contenu dans 10 mg. de matière protéique, on peut écrire :

$$\frac{x}{0,8} = \frac{H'}{H}, \text{ d'où } x = 0,8 \frac{H'}{H}, \text{ et pour 100 milligr.}$$

$$\text{de matière protéique } x = 8 \frac{H'}{H}$$

5° *Séparation du Tryptophane.*

Des 10 cc. de la solution sodée primitive il reste un volume de 5 cc. 5. Nous faisons agir sur ces 5 cc. 5, 3 cc. de SO^4H^2 7N. Nous amenons à 25 cc., nous filtrons et prélevons un volume de 20 cc. sur lequel nous faisons agir le sulfate mercurique selon la méthode de Folin et Marenzi décrite plus haut (voir page 98).

6° *Dosage de la Tyrosine sur la liqueur privée de Tryptophane.*

La suite des manipulations nous donne une liqueur, qui après action de la chaleur, du nitrite de soude est amenée à 100 cc., et comparée à une solution type de tyrosine effectuée selon la méthode des auteurs.

Nous obtenons les résultats suivants :

HAUTEURS EN MILLIMÈTRES

Solution de l'albuminoïde

H

Solution étalon de tyrosine

H'

x H'

On peut écrire : $\frac{x}{4} = \frac{H'}{H}$

4 H'

d'où $x = \frac{4 H'}{H}$ pour 20 cc. du filtrat ; comme nous étions

partis de 25 cc. on a :

$$x = \frac{4 H'}{H} \times \frac{25}{20} = \frac{5 H'}{H} \text{ pour 5 cc. 5 de la solution sodée.}$$

Pour 10 cc. :

$$x = \frac{5 H'}{H} \times \frac{10}{5,5} = \frac{10 H'}{1,1 H}$$

$$\text{Et pour 100 milligrammes : } X = \frac{5 H'}{1,1 H}$$

7° Dosage du Tryptophane.

Le culot de centrifugation mis en contact avec 100 cc. d'acide chlorhydrique normal, pendant une demi-heure au bain-marie bouillant donne une liqueur qui, filtrée, est amenée avec les eaux de lavage au volume de 10 cc. Nous divisons cette liqueur en deux parties.

a) Dosage par la réaction Folin-Marenzi.

A 5 cc. de la liqueur que nous diluons à 30 cc., nous ajoutons 12 c. 5 d'une solution saturée de carbonate de soude ; nous mélangeons et ajoutons 2 cc. 5 de réactif des

phénols de Folin et Ciocalteu. Nous laissons reposer et ajoutons 1 cc. de solution de cyanure de sodium à 5 %. Nous amenons à 50 cc. et comparons à une solution standard contenant 1 mgr. de tyrosine pour 100 cc. sous 20 $\frac{m}{m}$.

Nous obtenons les résultats suivants :

HAUTEURS EN MILLIMÈTRES

Solution d'albuminoïde	Solution standard de tyrosine
H	H'

$$\text{On peut écrire : } \frac{x}{1} = \frac{H'}{H} \text{ pour 100 cc.}$$

$$\text{Pour 50 cc. : } x = \frac{H'}{2 H} \text{ ou pour 5 cc. de liqueur primitive.}$$

$$\text{Pour 10 cc. : } x = \frac{H'}{H}. \text{ Ce qui correspond au filtrat}$$

de 20 cc. effectué avant la séparation. Pour les 25 cc. primitifs :

$$x = \frac{H'}{H} \times \frac{25}{20}$$

Ce qui correspond aux 5 cc. 5 de solution sodée de matière albuminoïde. Pour 10 cc. :

$$x = \frac{25 H'}{20 H} \times \frac{10}{5,5} = \frac{25 H'}{11 H}$$

pour 200 mgr. de matière protéique.

$$\text{Pour 100 mgr. : } x = \frac{25 H'}{22 H}$$

Pour exprimer ce chiffre en *tryptophane* nous devons
écrire : $\frac{25 \text{ H}'}{22 \text{ H}} \times 0,843$ pour 100 mgr. de matière
protéique.

b) Dosage par la réaction xanthoprotéique :

Sur l'autre partie de la solution, soit sur 5 cc. nous
opérons le mélange suivant :

5 cc. de solution albuminoïde.

50 cc. d'acide azotique N/10.

2 cc. de solution de NaNO_2 à 10 %.

Nous portons au bain-marie bouillant pendant
45 minutes. Nous refroidissons, ajoutons 2 cc. de solution
de cyanure de sodium à 5 %. Nous obtenons un volume
de 59 cc. 5 ; pour arriver à nous placer au pH 8,6 nous
opérons le mélange suivant :

5 cc. de solution nitrique + 1 cc. 2 de solution de
soude à 5 % de lessive de soude (quantité déterminée au
comparateur). Volume obtenu : 6 cc. 2. Nous portons
au colorimètre et comparons avec une solution de m. nitro-
phénol diluée au 1/10^e.

Pour fixer les idées, supposons que l'on obtienne les
résultats suivants :

HAUTEURS EN MILLIMÈTRES

Solution tamponnée

5

Solution de m. nitrophénol

7,3

Comme la solution de m. nitrophénol est ici à 10 mgr.

pour 1.000 cc. on peut dire que la concentration de ces 6 cc. 2 de solution tamponnée exprimée en m. nitrophénol est donnée par le rapport :

$$\frac{x}{10} = \frac{7,3 \times 6,2}{5 \times 1000} \text{ ou } x = 0,0905 \text{ ce qui correspond}$$

à 5 cc. de solution non tamponnée.

Pour les 59 cc. 5 nous obtenons :

$x = 1,076$ ce qui correspond aux 5 cc. de la solution chlorhydrique primitive.

Pour 10 cc. :

$$x = 1,076 \times 2 = 2,152$$

ce qui correspond à 20 cc. du filtrat effectué avant la séparation.

Pour les 25 cc. primitifs on a :

$$\frac{2,152 \times 25}{20} = 2,690$$

ce qui correspond à 5 cc. 5 de la solution sodique de matière protéique.

Pour 10 cc. on a :

$$\frac{2,690 \times 10}{5,5} = 4,899 \text{ pour } 0,20 \text{ de matière protéique.}$$

Pour 100 mgr. :

$$\frac{4,899}{2} = 2,449$$

Comme la valeur en métanitrophénol de 0 gr. 001 de tryptophane est de 1,46 nous obtenons comme pourcentage en tryptophane :

$$\frac{2,449}{1,46} = 1 \text{ mgr. } 677$$

Nous avons appliqué l'ensemble de la technique à cinq matières protéiques : albumine d'œuf, gélatine, caséine, édestine, fibrine. Nous donnons ci-dessous les résultats exprimés en tyrosine et en tryptophane pour cent de matières protéiques.

BLANC D'ŒUF						
Avant séparation du tryptophane			Après séparation du tryptophane			
Tyrosine			Tyrosine		Tryptophane	
Réaction de Millon-Zuwerkalow	Réaction xanthoprotéique	Réaction de Folin-Greenberg	Réaction de Millon- Folin-Marenzi	Réaction de Folin et Marenzi	Réaction xanthoprotéique	
5,36	4,46	7,34	5,09	2,27	1,98	
5,26	4,51	7,02	5,03	2,17	1,86	
5,31	4,31	7,10	5,13	2,21	1,99	
Moyenne : 5,31	4,42	7,15	5,08	2,21	1,94	
GÉLATINE						
0,23	0,22	0,61	0,43	0,12	0	
0,23	0,23	0,63	0,44	0,11	0	
0,23	0,22	0,63	0,42	0,11	0	
Moyenne : 0,23	0,22	0,62	0,43	0,11	0	

CASÉINE

5,72	6,21		7,21	0,78	1,42
6,25	6,11	6,36	6,60	0,80	1,19
6,32	6,12	6,44	6,70	0,88	1,30
Moyenne : 6,09	6,14	6,40	6,83	0,82	1,30

EDESTINE DE CHÉNEVIS

4,00	4,57	6,18	4,92	0,77	1,95
4,08	4,68	6,16	5,42	0,77	1,76
Moyenne : 4,04	4,62	6,17	5,31	0,96	1,67
			5,21	0,83	1,79

FIBRINE DESSÉCHÉE

8,23	4,45	8,88	6,67	1,86	1,27
8,08	5,22	8,00	6,88	1,66	1,43
7,91	5,39	8,04	6,77	1,67	1,49
Moyenne : 8,07	5,02	8,30	6,74	1,73	1,39

Il est possible de récapituler tous ces résultats en un seul tableau et de transformer en tyrosine les chiffres donnés pour le tryptophane afin de pouvoir comparer ces résultats entre eux. Il suffit pour cela de les multiplier par des coefficients que nous avons calculés. Pour la réaction de Folin et Marenzi après séparation du tryptophane il suffira de multiplier les chiffres trouvés pour ce dernier par $\frac{1}{0,843}$ et pour la réaction xanthoprotéique après séparation du tryptophane de multiplier par le facteur 0,304. Nous obtenons alors le tableau suivant :

RÉSULTATS EXPRIMÉS EN TYROSINE %						
Réaction globale				Réaction après séparation du Tryptophane		
	Indice de Millon-Zuwerkalow	Indice xanthoprotéique à pH 8,6	Indice de Folin-Greenberg	Indice de Tyrosine Millon-Folin	Indices de Tryptophane exprimés en tyrosine	
					de Folin-Marenzi	xanthopothéique
Albumine d'œuf	5,31	4,42	7,15	5,08	2,62	0,58
Edestine	0,23	0,22	0,62	0,43	0,14	0
Gélatine	6,09	6,14	6,40	6,83	0,97	0,39
Fibrine	4,04	4,62	6,17	5,21	0,98	0,54
Caséine	8,07	5,02	8,30	6,74	2,05	0,42

Discussion des résultats

Nous ne tiendrons pas compte pour nos comparaisons des résultats obtenus avec la gélatine ; les quantités trou-

vées pour la tyrosine et le tryptophane étant très faibles et du même ordre de grandeur que les erreurs que nous pouvons faire dans nos dosages. Nous commenterons d'abord les résultats obtenus pour les divers indices : Millon (technique de Zuwerkalow), Folin (technique de Greenberg), xanthroprotéique (technique de Tilmann modifiée), d'abord en comparant, *pour chacun d'eux*, les valeurs obtenues avant et après hydrolyse, de façon à nous rendre compte de l'influence de l'hydrolyse ; ensuite en mettant en parallèle les résultats obtenus (avec ou sans hydrolyse) *pour les trois indices* pour chaque matière albuminoïde, de façon à juger dans quelle mesure concordent les trois chiffres donnés par ces indices.

Cherchant ensuite à décider de la valeur, au moins relative, des résultats de la méthode de Folin et Marenzi, pour la tyrosine et le tryptophane, nous comparerons la somme des valeurs obtenues séparément pour la tyrosine et le tryptophane avec l'indice de Folin selon Greenberg, déterminé sur le produit hydrolysé. Cette somme et cet indice doivent théoriquement coïncider.

Enfin nous examinerons comparativement les valeurs obtenues pour le tryptophane, d'une part par la méthode de Folin et Marenzi au moyen du réactif phosphomolybdotungstique, d'autre part par la réaction xanthroprotéique appliquée au précipité tryptophanique obtenu dans cette même méthode Folin-Marenzi.

1. - Comparaison de chaque indice avant et après hydrolyse.

A. — Dans la réaction de Millon selon Zuwerkalow.

	Albumine d'œuf	Caséïne	Edestine	Fibrine
Avant hydrolyse.	5,60	6,46	5,20	7,70
Après hydrolyse.	5,31	6,09	4,04	8,07

Nous trouvons, sauf pour l'édestine, une concordance assez satisfaisante, permettant d'admettre que l'hydrolyse n'est pas nécessaire.

B. — Dans la réaction de Folin selon Greenberg

	Albumine d'œuf	Caséïne	Edestine	Fibrine
Avant hydrolyse.	8,82	6,80	6,32	7,77
Après hydrolyse.	7,15	6,40	6,17	8,30

On voit que, sauf pour la fibrine, on obtient sans hydrolyse prolongée des résultats plus élevés qu'avec hydrolyse. Faut-il admettre une destruction partielle pendant l'hydrolyse ? Cette hypothèse n'est pas invraisemblable, même si l'on constate que la tyrosine et le tryptophane pris à l'état pur soumis aux conditions de cette hydrolyse peuvent être retrouvés presque intégralement ; car on ne peut conclure de ce qui se passe dans ce cas à ce qui a lieu au

cours de la dislocation progressive de la molécule protéique. Toutefois, cette explication reste une hypothèse.

C. — Dans la réaction xanthoprotéique

	Albumine d'œuf	Caséine	Edestine	Fibrine
à pH 8,6 :				
Avant hydrolyse.	4,47	7,87	4,64	5,22
Après hydrolyse.	4,42	6,14	4,62	5,02

La comparaison des indices xanthoprotéiques avant et après hydrolyse montre trois fois sur quatre une bonne coïncidence. Il ne semble pas que l'hydrolyse introduise des modifications profondes retentissant sur la détermination de l'indice.

2. - Comparaison des trois indices, avant et après hydrolyse, sur chaque matière albuminoïde.

	Zuwerkalow	Folin- Greenberg	Xantho- protéique
Albumine d'œuf :			
Avant hydrolyse ..	5,60	8,82	4,47
Après hydrolyse...	5,31	7,15	4,42
Caséine :			
Avant hydrolyse ..	6,46	6,80	7,87
Après hydrolyse...	6,09	6,40	6,14
Edestine :			
Avant hydrolyse ..	5,20	6,32	4,64
Après hydrolyse...	4,04	6,17	4,62
Fibrine :			
Avant hydrolyse ..	7,70	7,77	5,22
Après hydrolyse...	8,07	8,30	5,02

Si l'on compare les résultats des réactions de Zuwerkalow et Folin-Greenberg, presque toujours très comparables, les deux cas où il y a divergence sont précisément ceux où l'on avait constaté des différences selon que l'on opérait d'hydrolyse ou pas.

Par contre l'indice xanthoprotéique n'est jamais supérieur (sauf un cas aberrant dans le cas de la caséine qui, elle aussi a montré des divergences très marquées avant et après hydrolyse), et le plus souvent inférieur aux deux autres.

On ne peut donc se défendre de penser que la réaction de Zuwerkalow dose autre chose que la tyrosine puisque ses résultats coïncident avec ceux de la réaction de Folin-Greenberg qui, comme nous le verrons plus loin (page 122), paraît bien doser l'ensemble tyrosine + tryptophane, et que ces mêmes résultats sont plus élevés que ceux de la réaction xanthoprotéique dans laquelle intervient certainement le tryptophane, mais pour une part relativement peu importante (à cause de sa faible « valeur en couleur »).

3. - Comparaison de l'indice de Folin-Greenberg avec la somme tyrosine + tryptophane selon Folin et Marenzi, après séparation du tryptophane.

	Albumine d'œuf	Caséine	Edestine	Fibrine
(Folin et Marenzi)				
Tyrosine	5,08	6,83	5,21	6,74
Tryptophane ...	2,62	0,97	0,98	2,05
TOTAL...	7,70	7,80	6,19	8,79
Indice de Folin- Greenberg ...	7,15	6,40	6,17	8,30

On voit que les chiffres donnés par la réaction de Folin-Greenberg, sans hydrolyse, sont à peu près les mêmes que ceux que donnent après séparation du tryptophane, d'une part la réaction de Millon-Folin-Marenzi et d'autre part la réaction de Folin-Marenzi. Il faut toutefois constater que les indices de Folin-Greenberg sont en général inférieurs aux précédents.

4. - Comparaison des valeurs trouvées pour le tryptophane par la réaction de Folin et Marenzi et par la réaction xanthoprotéique appliquées au précipité mercurique dans la même réaction de Folin-Marenzi.

	Réaction de Folin-Marenzi	Réaction xanthoprotéique
Albumine d'œuf	2,21	1,94
Caséine	0,82	1,30
Edestine	0,83	1,79
Fibrine.	1,73	1,39

Si pour l'albumine de l'œuf les résultats sont à peu près identiques, il n'en est pas de même pour les autres. Nettement inférieurs dans le cas de la fibrine, les résultats de la réaction xanthoprotéique sont fortement supérieurs à ceux de la réaction de Folin et Marenzi, en particulier dans le cas de l'édestine.

REMARQUE :

Nous nous sommes demandés si les résultats obtenus

ne seraient pas plus favorables en utilisant une méthode d'hydrolyse diastasique des matières protéiques. Comme nous l'avons déjà dit plus haut, l'on serait en droit d'attendre d'une telle méthode une hydrolyse moins brutale, car le contact prolongé de la soude concentrée avec les matières protéiques pendant des périodes variant de 12 à 18 heures et pouvant même aller jusqu'à 26 heures (caséine) ne donne-t-il pas des produits de transformation susceptibles d'influer sur la réaction colorée ?

Nous avons donc pensé à utiliser une méthode décrite par Mac Farlane et Fulmer.

Méthode de Mac Farlane et Fulmer [20]

Description de la technique :

Une quantité voisine de 1 gramme de matière protéique est mise à digérer pendant 10 heures à 37° avec 50 cc. d'HCl N/10 contenant 0 gr. 20 % de pepsine. Au bout de ce temps, neutraliser le digesté avec 5 cc. de NaOH N et ajouter 5 cc. d'une solution de trypsine à 6 % dans de la soude décinormale. Poursuivre la digestion pendant 24 heures, au bain-marie, puis détruire l'activité des deux enzymes par un chauffage à 75-80° pendant 5 minutes. Acidifier le digesté avec de l'acide sulfurique, diluer à 100 cc. et filtrer. Auparavant on aura eu soin d'ajouter une petite quantité de kaolin à la liqueur de façon à obtenir un liquide clair à la filtration.

Opérer ensuite la réaction de Folin et Ciocalteu sur

une quantité de liqueur variant de 1 à 8 cc. suivant la matière protéique utilisée (voir page 97).

Remarque :

1° La digestion par enzyme introduit dans la réaction des quantités de tyrosine et de tryptophane qu'il est nécessaire de doser dans un essai préalable. Pour cela, les auteurs conseillent de faire un témoin en opérant sur les ferments en l'absence de matières albuminoïdes, mais additionnés de quantités connues de tyrosine et de tryptophane. Par différence on en déduit les quantités de tyrosine et de tryptophane contenues dans les ferments. Par la suite, au cours des différents dosages, il suffira de déduire ces dernières quantités pour connaître les chiffres exacts de tyrosine et de tryptophane contenues dans les matières albuminoïdes.

2° Les auteurs conseillent, en outre, de faire précéder la digestion trypsique de l'action de la pepsine qui a l'avantage, à leur avis, de libérer très rapidement la plus grande partie du tryptophane.

Nous avons suivi exactement cette méthode, sauf en ce qui concerne l'emploi de la trypsine. Nous avons pensé que la trypsine U. S. P. indiquée par les auteurs pouvait être remplacée sans inconvénient par une bonne pancréatine Codex ; c'est pourquoi nous nous sommes contentés d'opérer une solution de pancréatine pure à 6 % dans de la soude décimale.

Avant d'entreprendre la séparation de la tyrosine et du tryptophane nous avons voulu vérifier si l'hydrolyse par

ferment améliorait les résultats obtenus précédemment par les réactions de Millon, xanthoprotéique et Folin-Greenberg. Nous avons donc opéré ces trois réactions sur la liqueur d'hydrolyse, nous avons obtenu les résultats suivants, exprimés en tyrosine :

	Indice de Millon-Zuwerkalow		Indice xanthoprotéique		Indice de Folin-Greenberg	
	Hydrolyse		Hydrolyse		Hydrolyse	
	p ^r ferment (1)	alcaline	p ^r ferment (1)	alcaline	p ^r ferment (1)	alcaline
Albumine d'œuf...	6,23	5,30	5,72	4,42	6,74	7,15
Gélatine	0,022	0,230	0	0,229	0,022	0,632
Caséine	5,73	6,09	5,66	6,14	6,32	6,35
Edestine	3,78	4,04	3,85	4,62	3,64	6,17
Fibrine	6,16	5,07	5,86	5,20	8,26	8,10

(1) Défalcation de la quantité d'amino-acides amenée par les ferments.

Sauf en ce qui concerne l'albumine de l'œuf et la fibrine pour lesquels on obtient des résultats un peu supérieurs, on constate que la méthode d'hydrolyse par ferments ne semble pas présenter, dans le cas de matière protéique isolée, d'avantages bien nets. Tous les chiffres obtenus sont de même ordre de grandeur (1) et dans ces conditions il nous semble préférable de considérer comme plus pratique l'hydrolyse alcaline ; il est en outre difficile de distinguer parmi ces trois modes opératoires, celui qui constitue le dosage le plus exact.

(1) Nous considérons la valeur obtenue pour l'édestine par la réaction de Folin-Greenberg comme aberrante.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Résumé

Ce travail est consacré à l'examen comparé de quelques dosages colorimétriques de la tyrosine et du tryptophane dans quelques matières protéiques déterminées.

1° Nous avons étudié les méthodes suivantes :

a) Le procédé de Zuwerkalow pour la détermination d'un indice de Millon.

b) Le procédé Greenberg pour la détermination de l'indice de Folin.

c) Le procédé de Tillmann, Hirsh et Stoppel soit pour le dosage simultané de la tyrosine et du tryptophane, soit pour la détermination d'un indice par la réaction xantho-protéique, indice n'intéressant que le tryptophane seul préalablement séparé selon la méthode de Folin et Marenzi.

d) Le procédé de Folin et Marenzi pour la détermination de la tyrosine et du tryptophane (après séparation par le mercure) la première par une réaction de Millon, la deuxième par la réaction de Folin-Cicalteu.

Dans tous les cas, non seulement nous avons contrôlé la méthode sur des solutions d'acides aminés purs, mais nous avons aussi été amenés à la modifier et à l'améliorer.

2° Nous avons tenté de déterminer la valeur des résultats obtenus par ces techniques en les appliquant d'une façon simultanée à cinq matières protéiques déterminées : albumine d'œuf, gélatine, caséine, édestine, fibrine, et en comparant les résultats obtenus.

a) En ce qui concerne les indices nous avons d'abord comparé les résultats avant et après hydrolyse, ensuite nous avons mis en parallèle les trois indices pour chaque matière protéique, enfin nous avons étudié la valeur comparative de l'hydrolyse diastasique et de l'hydrolyse alcaline.

b) En ce qui concerne le dosage séparé de la tyrosine et du tryptophane nous avons comparé la somme des valeurs obtenues respectivement pour la tyrosine et le tryptophane dans le procédé Folin-Marenzi, avec l'indice de Folin selon Greenberg qui théoriquement devraient être identiques, puis les valeurs obtenues pour le tryptophane d'une part d'après cette technique, d'autre part par application de la réaction xanthoprotéique.

Conclusion

1° La conclusion la plus générale qui se dégage de ces recherches, c'est qu'il est bien difficile d'obtenir par ces méthodes des résultats superposables, et bien délicat de déterminer la ou les causes de leurs divergences.

2° Cependant, en ce qui concerne les trois indices étudiés, l'indice de Millon-Zuwerkalow, l'indice xanthoprotéique et l'indice de Folin-Greenberg, l'hydrolyse préalable n'apparaît pas comme nécessaire ; et si l'on est

amené à pratiquer cette hydrolyse il ne semble pas indispensable d'opérer une hydrolyse diastasique, car l'hydrolyse alcaline mène à des résultats de même ordre.

3° Des trois indices étudiés, l'indice de Millon selon Zuwerkalow et l'indice de Folin selon Greenberg ont des valeurs comparables, tandis que l'indice xanthoprotéique est le plus souvent nettement moins élevé. Ces indices dont la détermination relativement facile mène à des résultats assez constants peuvent être considérés comme des « constantes » des matières protéiques.

4° Comme l'indice de Greenberg représente à peu près la somme de tyrosine + tryptophane, obtenue par la méthode de Folin et Marenzi, il semble que les résultats fournis par cette méthode aient une certaine valeur relative. Par contre les résultats obtenus pour le tryptophane, selon qu'on le dose par la réaction phosphomolybdotungstique ou par la réaction xanthoprotéique, sont assez divergents et semblent montrer que ces réactions dosent, en plus du tryptophane, des produits différents.

Les conclusions si modestes de ce travail ont, tout au moins, nous semble-t-il, le mérite de montrer que le problème du dosage colorimétrique des acides aminés est fort complexe et que les résultats des dosages doivent être interprétés avec la plus grande prudence.

Vu, bon à imprimer :
Le Président de Thèse,
Henri HÉRISSEY.

Vu :
Le Doyen de la Faculté,
Paul GUÉRIN.

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
S. CHARLÉTY.

BIBLIOGRAPHIE

1. ABDERHALDEN ET KEMPE. — *Physiol. Chem.*, 1907, **52**, 207.
2. CLARK (W. Mansfield). — *The determination of hydrogen ions*, Baltimore, 1920.
3. DAKIN. — *Biochemical Journal*, 1908, **12**, 290.
4. FASAL. — *Biochem. Zeitschrift*, 1912, **44**, 392.
5. FOLIN ET CIOCCALTEU. — *J. of Biol. Chemistry*, 1927, **73**, 627.
6. FOLIN ET DENIS. — *J. of Biol. Chemistry*, 1912, **12**, 247, et 1913, **14**, 457.
7. FOLIN ET LOONEY. — *J. of Biol. Chemistry*, 1922, **51**, 421.
8. FOLIN ET MARENZI. — *J. of Biol. Chemistry*, 1929, **83**, 89-102.
9. FÜRTH. — *Habilitationsschrift*, Strasburg, 1899 (d'après LIEBEN).
10. GIBBS. — *J. of Biol. Chemistry*, 1926, **01**, 447.
11. GREENBERG. — *J. of Biol. Chemistry*, 1929, **82**, 545.
12. HERZFELD. — *Biochem. Zeitschrift*, 1913, **56**, 82.
13. HOFFMAN. — *Ann. Chem. u. Pharm.*, 1853, **11**, 123.
14. HOLM ET GREENBANK. — *Journ. american chem. soc.*, 1923, **45**, 1788.
15. HOMER. — *J. of Biol. Chemistry*, 1915, **22**, 369.
16. HOPKINS ET COLE. — *Journal of Physiology*, 1901, **27**, 418.
17. KÜHNE ET RUDNEFF. — *Virchow's Archiv.*, 1865, **33**, 71.
18. LEVENE ET ROUELLEN. — *J. of Biol. Chemistry*, 1902, **2**, 481.
19. LIEBEN. — *Biochem Zeitschrift*, 1924, **145**, 535-554.
20. MAC FARLANE ET FÜLMER. — *The Biochem. Journal*, 1930.
21. LOTHAR MEYER. — *Ann. Chem. u. Pharm.*, 1884, **56**, 156.
22. E. MILLON. — *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, 1849, **28**, 40.
23. C. TH. MÖRNER. — *Z. Physiol. Chem.*, 1919, **107**, 203-210.
24. MORACZEWSKI. — *Biochem. Zeitschrift*, 1913.
25. NASSE. — *Sitzungsber. Naturf. ges. zu Halle*, 1879.
— *Pflüger's Archiv*, 1901, **83**, 361.

26. ONSLOW. — *Biochem. Journal*, 1924, **18**, 63.
27. PLUGGE. — *Zeit. analyt. Chemie*, 1872, **11**, 173.
28. STADELER. — *Ann. Chem. u. Pharm.*, 1860, **40**, 37.
29. THOMAS. — *Bulletin de la Société de Chimie Biologique*, 1914,
1, 67.
— *Annales de l'Institut Pasteur*, 1920, **34**, 701.
30. TILLMANN J., HIRSCH P., STOPPEL F. — *Biochem. Zeitschrift*,
1928, **198**, 379-401.
31. VAUBEL. — *Zeit. Angew. Chemie*, 1900, 1125.
32. VOISENET. — *Bulletin de la Société de Chimie*, 1905, **33**, 1198.
33. ZUWERKALOW. — *Biochem. Zeitschrift*, 1927, **163**, 185.
-

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	9
RÉSUMÉ HISTORIQUE DES PRINCIPALES RÉACTIONS COLO- RÉES DE LA TYROSINE ET DU TRYPTOPHANE DANS LEUR APPLICATION AU DOSAGE DE CES DEUX ACIDES AMINÉS	13
A. La Réaction de Millon :	
1) Son origine, ses modifications, son méca- nisme	13
2) Utilisation de la réaction de Millon comme dosage	15
B. La Réaction xanthoprotéique :	
Son origine, ses modifications, variations en fonctions du pH.....	18
C. La Réaction de Folin :	
Son origine, variétés de réactifs.....	21
CHAPITRE I.	
ETUDE DE LA MÉTHODE DE ZUWERKALOW.....	31
Technique de la méthode.....	31
Examen critique, essais d'amélioration.....	32
CHAPITRE II.	
ETUDE DE LA MÉTHODE DE GREENBERG.....	47
Technique de la méthode.....	48
Etude critique	50
CHAPITRE III.	
ETUDE DE LA MÉTHODE DE TILLMANN, HIRSH ET STOPPEL	61

Principe de la méthode.....	61
Etude critique	61
Essais d'adaptation de la méthode de Tillmann, Hirsh et Stoppel, de façon à permettre l'em- ploi simultané d'autres méthodes.....	88

CHAPITRE IV

ETUDE DE LA MÉTHODE DE FOLIN ET MARENZI.....	97
Description de la technique.....	97
Contrôle de cette technique.....	103

CHAPITRE V.

ÉTUDE COMPARATIVE DES DIVERSES MÉTHODES ÉTUDIÉES DANS LES CHAPITRES PRÉCÉDENTS	105
Technique utilisée	106
Résultats obtenus	116
Discussion des résultats	118
MÉTHODE DE MAC FARLANE ET FULMER.....	124
Description de la technique	124
Résultats obtenus	126
RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS	127
BIBLIOGRAPHIE	131
